Flavia Letícia Martins

O bloqueio em longo prazo do receptor do peptídeo-1 semelhante ao glucagon eleva os níveis de pressão arterial sistólica em ratos hipertensos e normotensos

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de: Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios Genéticos de Desenvolvimento e Metabolismo

Orientadora: Prof^a Dr^a Adriana Castello Costa Girardi

São Paulo

2019

Flavia Letícia Martins

O bloqueio em longo prazo do receptor do peptídeo-1 semelhante ao glucagon eleva os níveis de pressão arterial sistólica em ratos hipertensos e normotensos

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de: Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios Genéticos de Desenvolvimento e Metabolismo

Orientadora: Prof^a Dr^a Adriana Castello Costa Girardi

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Martins, Flavia Letícia

O bloqueio em longo prazo do receptor do peptídeo-1 semelhante ao glucagon eleva os níveis de pressão arterial sistólica em ratos hipertensos e normotensos / Flavia Letícia Martins. -- São Paulo, 2019.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências Médicas. Área de
Concentração: Distúrbios Genéticos de
Desenvolvimento e Metabolismo.

Orientadora: Adriana Castello Costa Girardi.

Descritores: 1.Incretinas 2.Hipertensão
3.Túbulos renais proximais 4.Trocadores de sódio-
hidrogênio 5.Insulina 6.Angiotensinogênio 7.Pressão
arterial

USP/FM/DBD-246/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Dedico esta Dissertação à minha família. Em especial à Ana Maria (mãe), Terezinha (tia e madrinha), Juliana (irmã/prima) e Maria Ap^a (avó) (in memoriam), mulheres vigorosas que são meus parâmetros de coragem, determinação e caráter.

AGRADECIMENTOS

À Profª Drª Adriana C. C. Girardi pela paciência e ensinamentos durante meu processo de aprendizado e amadurecimento profissional. Agradeço pela oportunidade de fazer parte de um grupo de pesquisa cujo propósito é comprometimento e excelência para com a ciência. Ter uma líder mulher e com sua competência profissional é uma honra e inspiração pessoal.

Aos meus amigos do grupo cardiorrenal e proteômica. Obrigada pela ajuda, paciência, incentivo, carinho e respeito. Vocês foram fundamentais neste caminho e contribuíram para meu desenvolvimento, além de representarem valiosas amizades e laços estabelecidos durante esse período.

À banca examinadora titular e suplente pelo aceite do convite e contribuição neste processo de aprendizado.

Aos pesquisadores e funcionários do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular (LGCM), local onde desenvolvi e aprimorei meus conhecimentos durante meu período de iniciação científica e mestrado.

À FAPESP, obrigada pela apreciação do projeto de pesquisa e pelo apoio financeiro a este estudo.

À minha Mãe, Ana Maria. Obrigada por ser mãe, pai, companheira e protetora. Obrigada por ter me ensinado o valor do trabalho e disciplina de forma severa, mas extremamente carinhosa.

Aos meus tios e padrinhos, Terezinha Araujo e Julio Pires. Obrigada por acreditarem em meu potencial e por sempre estarem ao meu lado.

À minha avó, Maria Capobianco (*in memoriam*) e meu avô, José Araújo (*in memoriam*), deixo meu eterno obrigada. Suas contribuições com histórias e experiências motivadoras me incentivaram e me ajudaram desde sempre.

Aos meus irmãos/primos Juliana e Gianluca meu sincero agradecimento, certamente vocês fazem da minha vida uma grande alegria. Obrigada por estarem sempre ao meu lado e por representarem verdadeiras paixões para mim.

Ao Acaris Benetti, meu companheiro e amigo, agradeço de todo coração a ajuda e incentivo. Obrigada por estar ao meu lado, você certamente me ajudou a concluir mais uma etapa da minha vida.

A todos aqueles que com seu jeito, com sua energia e harmonia me motivaram, incentivaram e me ajudaram a permanecer em minha jornada. Com certeza cada um, de uma forma particular, foi essencial nesta etapa do meu caminho. Muito obrigada.

*“As you start to walk on the
way, the way appears.”*

Jalaladim Maomé Rumi

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas em vigor:

Referências: *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Manuscrito: Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3^a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. O peptídeo-1 semelhante ao glucagon	1
1.1.1. Síntese, secreção e acoplamento ao GLP-1R	1
1.1.2. Papel na homeostase glicêmica e Diabetes mellitus do tipo 2	4
1.1.3. Degradação enzimática pela dipeptidil peptidase IV e desenvolvimento das terapias baseadas em incretinas	6
1.1.3.1. Inibidores da DPPIV	7
1.1.3.2. Incretinomiméticos	8
1.2. Efeitos extraglicêmicos do GLP-1	9
1.2.1. Efeitos renais do GLP-1	12
1.2.1.1. Efeitos endógenos do GLP-1 sobre o rim	14
1.2.2. Efeitos anti-hipertensivos do GLP-1	15
1.2.2.1. O papel do rim na gênese e manutenção da Hipertensão arterial	16
1.2.3. Manuseio renal de Na ⁺ na HA: papel do NHE3	22
1.3. Hipótese do estudo	26
2. OBJETIVOS	27
2.1. Objetivo geral	27
2.2. Objetivos específicos	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1. Reagentes – peptídeos exendin-9 e exenatide	28
3.2. Modelos experimentais	28
3.3. Avaliação da função renal	31
3.4. Avaliação indireta da PA	32

3.5.	Avaliação dieta da PA	34
3.6.	Teste de tolerância oral à glicose do inglês <i>Oral Glucose Tolerance Test</i> – OGTT)	36
3.7.	Eutanásia e descarte do material biológico	36
3.8.	Preparação do homogenato de proteínas de córtex renal e determinação da concentração proteica	37
3.9.	Eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS para proteína	37
3.10.	<i>Immunoblotting</i>	38
3.11.	ELISA para AGT urinário	39
3.12.	Determinação da atividade da PKA em córtex renal	39
3.13.	ELISA para insulina de jejum	40
3.14.	Imunohistoquímica	40
3.15.	Análise estatística	41
4.	RESULTADOS	42
4.1.	Efeitos do bloqueio em longo prazo do GLP-1R sobre os níveis pressóricos e função renal de ratos <i>SHR</i> e <i>Wistar</i>	42
4.2.	Efeitos do bloqueio em longo prazo da via de sinalização endógena do GLP-1/GLP-1R em córtex renal de ratos <i>SHR</i> e <i>Wistar</i>	47
4.3.	Efeitos do bloqueio em longo prazo do GLP-1R sobre a fosforilação do NHE3 em túbulo proximal de ratos <i>SHR</i> e <i>Wistar</i>	48
4.4.	Efeitos do bloqueio em longo prazo do GLP-1R sobre o dano renal em ratos <i>SHR</i> e <i>Wistar</i>	51
4.5.	Efeitos do bloqueio em longo prazo do GLP-1R sobre a homeostase glicêmica em ratos <i>SHR</i> e <i>Wistar</i>	53
4.6.	Efeitos do bloqueio em longo prazo do GLP-1R sobre o SRA intra-renal	56
5.	DISCUSSÃO	58
6.	CONCLUSÃO	64
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -SMA: α Actina de músculo liso

AC: Adenilil Ciclase

AC IV: Anidrase Carbônica IV

AC II: Anidrase Carbônica II

AGT: Angiotensinogênio

AMPC: Monofosfato cíclico de adenosina

AKT: Proteína cinase B

Ang II: Angiotensina II

ANOVA: Análise de variância

ATP: Adenosina trifosfato

AUC: Área sobre a curva

BSA: Albumina de Soro Bovina

CEMIB: Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na área de ciência em animais de laboratório

CE Na⁺: Carga excretada de sódio

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

COBEA: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

DAB 3,3': Di-amino-benzidina

DM 2: Diabetes Mellitus do tipo 2

DPPIV: Dipeptidil Peptidase IV

DRC: Doença Renal Crônica

ECL: *Enhanced ChemiLuminescence*

EDTA: Etileno diamino tetracetato dissódico

ELISA: Ensaio de imunoabsorção enzimática

eNOS: NO sintase endotelial

EPM: Erro Padrão da Média

EPAC: Proteína de troca ativada pelo AMPc

EROs: Espécies Reativas de Oxigênio

Ex9: Exendin-9

Ex4: Exenatide

FC: Frequência Cardíaca

FDA: *Food and Drug Administration*

FE Na⁺: Fração de Excreção de sódio

GABA: Ácido gama aminobutírico

GM: Gaiola Metabólica

GLP-1: Peptídeo-1 semelhante ao glucagon

GLP-1R: Receptor do peptídeo-1 semelhante ao glucagon GLP-1Ra: Agonista do GLP-1R

GLUT 4: Transportador de glicose tipo 4

GPCR: Receptor acoplado à proteína G

HA: Hipertensão Arterial

HDL: Lipoproteínas de alta densidade

HRP: Anticorpo secundário conjugado à peroxidase

IC: Insuficiência Cardíaca

ICAM 1: Molécula de adesão intracelular tipo 1

IGFR: Receptor do fator de crescimento 1 semelhante à insulina

IHQ: Imunohistoquímica

i.p.: Intraperitoneal

IRS1: Substrato 1 do receptor de insulina

IRS2: Substrato 2 do receptor de insulina

K_{ATP}: Canais de K⁺ sensíveis ao ATP

L-NAME: N(w)-nitro-L-arginina metil éster

MMV: Microvilosidades

NF-κβ: Fator nuclear κβ

NBCel: Cotransportador de sódio e bicarbonato

NHE3: Isoforma 3 do trocador de Na^+/H^+

NO: Óxido nítrico

OKP: Opposum Kidney Clone P

OMS: Organização Mundial da Saúde

PA: Pressão Arterial

PAD: Pressão Arterial Diastólica

PAI-1: Inibidor do ativador de plasminogênio-1

PAS: Pressão Arterial Sistólica

PBS: Tampão fosfato salino

PC1: Pró-hormônio convertase 1

PC1/3: Pró-hormônio convertase 1/3

PI3K: Fosfoinositídeo 3-quinase

PKA: Proteína cinase dependente de AMPc

PMSF: Fluoreto de fenilmetilsulfonil

PS552: Serina 552 fosforilada

PP1: Proteína fosfatase 1

PPAR γ : Receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama

PTH: Paratormônio

PTMG: Pletismografia

RAP 1: Proteína 1 relacionada ao Ras

RFG: Ritmo de Filtração Glomerular

RNA_m: Ácido ribonucleico mensageiro

RPM: Rotação por minuto

SDS: Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacríamida

Ser/Thr PKA: Resíduos de serina e treonina fosforilados por PKA

SGK1: Quinase 1 regulada por soro e glicocorticoides

SGLT2: Cotransportador de sódio e glicose

SHR: Ratos espontaneamente hipertensos

SNC: Sistema Nervoso Central

SRA: Sistema Renina Angiotensina

TGF: Taxa de Filtração Glomerular

TGI: Trato GastroIntestinal

TP: Túbulo Proximal

Tris: Hidroximetilaminometano

WB: *Western Blot*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Síntese do GLP-1: Processamento pós-traducional do pré-pró-glucagon	1
Figura 2.	Representação da ligação GLP-1/GLP-1R e as principais vias de sinalização deflagradas	3
Figura 3.	Efeito incretina em indivíduos saudáveis e diabéticos	6
Figura 4.	Representação da degradação enzimática do GLP-1 pela DPPIV e mecanismo de ação das terapias baseadas em incretina	7
Figura 5.	Resumo esquematizado dos efeitos pleiotrópicos do GLP-1	10
Figura 6.	Representação gráfica das respostas de rápido, médio e longo prazo frente ao estímulo de alteração da PA	18
Figura 7.	Mecanismo de natriurese pressórica	19
Figura 8.	Situações em que a natriurese pressórica encontra-se alterada e promove hipertensão	20
Figura 9.	Reabsorção de sódio mediada pelo NHE3 em túbulo proximal renal	23
Figura 10.	Representação do NHE3 presente em túbulo proximal renal	25
Figura 11.	Desenho experimental para a linhagem <i>SHR</i>	30
Figura 12.	Desenho experimental para a linhagem <i>Wistar</i>	30
Figura 13.	Ilustração do pletismógrafo BP-2000 Série II (Visitech Systems®)	34
Figura 14.	Ilustração da aferição direta de PA através da canulação da artéria carótida	35
Figura 15.	O bloqueio em longo prazo do GLP-1R intensifica o aumento dos níveis pressóricos em ratos <i>SHR</i> e altera a pressão arterial em ratos <i>Wistar</i>	44
Figura 16.	O bloqueio em longo prazo do GLP-1R reduz a atividade da PKA em córtex renal de ratos <i>SHR</i>	47
Figura 17.	O bloqueio em longo prazo do GLP-1R reduz a razão relativa de fosforilação do NHE3 na serina 552 em túbulo proximal de ratos <i>SHR</i> e <i>Wistar</i>	49

Figura 18.	O bloqueio em longo prazo do GLP-1R intensifica o dano renal em ratos <i>SHR</i>	52
Figura 19.	O bloqueio em longo prazo do GLP-1R altera a homeostase glicêmica e aumenta a insulina sérica de jejum em ratos <i>SHR</i> e <i>Wistar</i>	55
Figura 20.	O bloqueio em longo prazo do GLP-1R aumenta a excreção urinária de AGT em ratos <i>SHR</i> e <i>Wistar</i>	56
Figura 21.	Compilação dos resultados constatados no estudo	63
Figura 22.	Modulação do NHE3 em resposta ao bloqueio em longo prazo do GLP-1R pode envolver ativação do SRA intrarrenal e hiperinsulinemia promovendo aumento de PA	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Inibidores da DPPIV disponíveis atualmente para uso sob prescrição médica	8
Tabela 2.	Incretinomiméticos disponíveis atualmente para uso sob prescrição médica	9
Tabela 3.	Lista de anticorpos utilizados no estudo	39
Tabela 4.	Efeitos do bloqueio em longo prazo do GLP-1R sobre peso corporal e função renal de ratos <i>SHR</i>	45
Tabela 5.	Efeitos do bloqueio em longo prazo do GLP-1R sobre peso corporal e função renal de ratos <i>Wistar</i>	45

RESUMO

Martins FL. *O bloqueio em longo prazo do receptor do peptídeo-1 semelhante ao glucagon eleva os níveis de pressão sistólica em ratos hipertensos e normotensos* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

O peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1) é um hormônio incretina envolvido primariamente na homeostase da glicose. Em concentrações farmacológicas, este peptídeo apresenta ações extraglicêmicas, incluindo efeitos diuréticos e natriuréticos e efeitos anti-hipertensivos tanto em pacientes como em modelos experimentais de hipertensão arterial sistêmica associada ou não ao diabetes. Ao longo dos últimos anos, nosso grupo de pesquisa demonstrou que as ações farmacológicas do GLP-1, bem como as de outros agonistas do receptor de GLP-1 (GLP-1R) como o exenatide, são mediadas, ao menos em parte, por meio da inibição da reabsorção de sódio via isoforma 3 do trocador de Na^+/H^+ (NHE3) em túbulo proximal (TP) renal. Adicionalmente, demonstramos que o bloqueio agudo da sinalização endógena do GLP-1R em ratos Wistar, por meio da administração do seu antagonista, exendin-9, promove efeitos antinatriuréticos e antidiuréticos, sugerindo que o GLP-1 endógeno exerce efeito modulatório sobre a reabsorção de sal e água. Esses efeitos renais são mediados tanto por meio de alterações do ritmo de filtração glomerular (RFG), como por diminuição dos níveis de fosforilação do resíduo de serina 552 do NHE3 em TP com consequente aumento da reabsorção de sódio dependente deste transportador. Entretanto, os efeitos do bloqueio em longo prazo do GLP-1R e suas possíveis implicações sobre a reabsorção de sódio em TP e, possivelmente, sobre a pressão arterial (PA), ainda permanecem desconhecidos. Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo testar a hipótese de que o GLP-1 endógeno exerce efeitos modulatórios sobre os níveis pressóricos e investigar os possíveis mecanismos subjacentes. Para isso, ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e normotensos (Wistar) com cinco semanas de idade foram tratados com salina (controle), com o antagonista do GLP-1R, exendin-9 (75 $\mu\text{g}/\text{rato}/\text{dia}$), ou com o agonista do GLP-1R, exenatide (10 $\mu\text{g}/\text{rato}/\text{dia}$), via intraperitoneal, durante quatro semanas. Comitê de ética: 915/2017 (SHR), 042/17 (Wistar). Semanalmente, realizou-se a aferição indireta da PA por pletismografia de cauda e, na última semana de tratamento, a aferição direta por meio da canulação da artéria carótida. Para avaliar a excreção urinária de angiotensinogênio (AGT) realizamos ensaio imunoenzimático (ELISA), enquanto que os resultados de expressão proteica foram avaliados por western blot (WB). Por meio da aferição indireta da PA constatamos que o tratamento com exendin-9 elevou os níveis pressóricos de SHR (199 ± 4 vs. 190 ± 1 mmHg, $p < 0,05$) e Wistar (140 ± 4 vs. $124 \pm 0,2$ mmHg, $p < 0,05$), quando comparados ao controle, ao passo que o tratamento com exenatide promoveu atenuação da elevação da PA apenas nos ratos SHR (178 ± 1 vs. 190 ± 1 mmHg, $p < 0,05$). Resultados semelhantes foram observados na avaliação direta da PA, na qual o tratamento com exendin-9 aumentou a pressão arterial sistólica em ratos SHR (149 ± 1 vs. 139 ± 3 mmHg, $p < 0,05$) e Wistar (116 ± 5 vs. 101 ± 1 mmHg, $p < 0,05$), comparados ao controle, enquanto que o tratamento com exenatide demonstrou atenuação do aumento da PA somente em SHR (127 ± 1 vs. 139 ± 3 mmHg, $p < 0,05$). O aumento nos níveis pressóricos no tratamento com exendin-9 foi acompanhado por diminuição dos níveis de fosforilação da serina 552 do NHE3 tanto em SHR (60 ± 5 vs. 100 ± 5 % SHR-Ctrl, $p < 0,01$) quanto em Wistar (81 ± 5 vs. 100 ± 4 % Wistar-Ctrl, $p < 0,05$), sugerindo indiretamente maior atividade deste transportador. Por outro lado, o

tratamento com exenatide apresentou maiores níveis de fosforilação deste transportador somente em SHR (114 ± 7 vs. 100 ± 5 % SHR-Ctrl, $p < 0.05$). Ademais, observamos aumento da excreção urinária de AGT em SHR (102 ± 9 vs. 47 ± 7 ng/mg, $p < 0.05$) e Wistar (16 ± 2 vs. 4 ± 1 ng/mg, $p < 0.05$), sendo este um marcador de ativação do sistema renina angiotensina (SRA) intrarrenal. Em contrapartida, o exenatide proporcionou redução significativa da excreção urinária de AGT em SHR. Mediante o exposto, concluímos que o bloqueio em longo prazo do GLP-1R intensifica o aumento da PA em ratos SHR e eleva os níveis pressóricos em ratos Wistar. Este efeito pressórico observado foi associado à maior reabsorção de sódio em TP pelo NHE3, e maior ativação do SRA intrarrenal em ambas as linhagens.

Descritores: incretinas; hipertensão; túbulos renais proximais; trocadores de sódio-hidrogênio; insulina; angiotensinogênio; pressão arterial.

ABSTRACT

Martins FL. *Long-term blockade of glucagon-like peptide-1 receptor increases systolic blood pressure levels in both hypertensive and normotensive rats* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2019.

Glucagon-Like Peptide is an incretin hormone evolved primarily in the glucose homeostasis. In pharmacology concentrations, this peptides shows extraglycemic actions, including diuresis, natriuresis, and anti-hypertensive effects in both patients and experimental models of arterial hypertension associated or not with diabetes. Over the last few years, our research group has demonstrated that the pharmacological actions of GLP-1, as well as other GLP-1 agonist receptors (GLP-1R), such as exenatide, are mediated, in part, by the inhibition of sodium reabsorption from activation of the isoform 3-sodium and hydrogen exchanger (NHE3) in the proximal tubule (PT). Additionally, we demonstrated that acute blockade of endogenous signalization of GLP-1 in Wistar rats, through GLP-1R antagonist administration (exendin-9) promotes anti-natriuretic and anti-diuretic outcomes, suggesting that endogenous GLP-1 exerts modulatory effect by the sodium and water reabsorption. These renal effects are mediated by alterations in the Glomerular Filtration Rate (GFR), in the same way as low phosphorylation levels of serine 552 residues of NHE3 in PT with consequent increases in NHE3-dependent sodium reabsorption. Although, the effects of the long-term blockade of GLP-1R and its possible implications on sodium reabsorption in PT and also maybe, on blood-arterial pressure (BP) remain unknown. Given the above, this study aims to test the hypothesis that endogenous GLP-1 exerts modulatory influences on arterial pressure levels and also intends to investigate possible adjacent mechanisms. For that, GLP-1R antagonist, exendin-9 (75 µg/rat/day), GLP-1 agonist, exenatide (10 µg/rat/day) or saline was administered intraperitoneally in 5-weeks age hypertensive (SHR) and also, normotensive (Wistar) rats during four weeks. Ethics Committee: 915/2017 (SHR), 042/17 (Wistar). Weekly, the indirect BP was performed through tail-plethysmography. We also measured direct BP through the carotid-cannulation method in the last week of treatment. To evaluate the urinary angiotensinogen (AGT) excretion, we performed the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and we used Western Blotting (WB) to assess protein expression. We found from the indirect measurement of BP that treatment with exendin-9 raised blood pressure levels of SHR (199 ± 4 vs. 190 ± 1 mmHg, $p < 0.05$) and Wistar (140 ± 4 vs. 124 ± 0.2 mmHg, $p < 0.05$) when compared to the control, whereas exenatide treatment demonstrated attenuation of BP elevation only in SHR rats (178 ± 1 vs. 190 ± 1 mmHg, $p < 0.05$). Similar results were observed in the direct measurement of BP, in which systolic blood pressure in SHR (149 ± 1 vs. 139 ± 3 mmHg, $p < 0.05$) and Wistar (116 ± 5 vs. 101 ± 1 mmHg, $p < 0.05$) was increased by exendin-9 treatment, compared to control, whereas exenatide treatment demonstrated attenuation of BP increase only in SHR rats (127 ± 1 vs. 139 ± 3 mmHg, $p < 0.05$). The increasing in BP in exendin-9 treatment in SHR followed lower levels of NHE3-phosphorylation (60 ± 5 vs. 100 ± 5 %SHR-Ctrl, $p < 0.01$) and Wistar (81 ± 5 vs. 100 ± 4 %Wistar-Ctrl, $p < 0.05$), suggesting an increase in this exchanger activity with higher sodium reabsorption in PT. On the other hand, the exenatide showed higher levels of NHE3 phosphorylation only in SHR rats (114 ± 7 vs. 100 ± 5 %SHR-Ctrl, $p < 0.05$). We also observed increases in AGT-urinary excretion in SHR (102 ± 9 vs. 47 ± 7 ng/mg, $p < 0.05$) and Wistar (16 ± 2 vs. 4 ± 1 ng/mg, $p < 0.05$), indicating activation of the renal Renin-Angiotensin System (RAS). In contrast, the exenatide proportioned decreasing in

AGT-urinary excretion only in SHR rats. Thus, we conclude that the long-term blockade of GLP-1R intensifies the increasing in BP in SHR rats and also elevates BP levels in Wistar rats. This effect was associated with higher sodium reabsorption in PT by NHE3, and intrarenal RAS activation in both lineages.

Descriptors: incretins; hypertension; kidney tubules, proximal; sodium-hydrogen exchangers; insulin; angiotensinogen; arterial pressure.

1. INTRODUÇÃO

1.1. O peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1)

1.1.1. Síntese, secreção e acoplamento ao GLP-1R

O GLP-1 é um hormônio incretina, envolvido primariamente com a homeostase glicêmica, secretado pelas células L intestinais em resposta à ingestão de alimentos e composto por 30 aminoácidos (1). Este hormônio foi descoberto a partir da clonagem e sequenciamento do gene que codifica o pró-glucagon (2), o pré-pró-glucagon. O RNAm do pró-glucagon codifica uma proteína precursora de 180 aminoácidos que passa por um processo pós-traducional tecido-específico, produzindo perfis peptídicos diferentes no cérebro, pâncreas e intestino. Nas células α pancreáticas, a proteína precursora é clivada pela enzima pró-convertase-2 (PC2), originando o glucagon. Enquanto que nas células L intestinais, a clivagem ocorre pela enzima pró-hormônio convertase-1/3 (PC1/3), originando o GLP-1 (3) (Figura 1).

Figura 1. Síntese do GLP-1: Processamento pós-traducional do pré-pró-glucagon. O GLP-1 é codificado pelo mesmo gene que o glucagon e outros peptídeos intestinais (A). A proteína precursora pró-glucagon (B) passa por modificações pós-traducionais pela ação das enzimas pró-hormônio convertase 2 e 1/3 (C), produzindo diferentes proteínas no pâncreas, intestino e cérebro. Essas enzimas são o fator limitante para a produção do

GLP-1, sendo que a PC 1/3 só é encontrada no cérebro e no intestino (Adaptado de Sandoval e D'Alessio, 2015) (4).

Os estímulos necessários para a secreção do GLP-1 pelas células L intestinais são fatores neurais, endócrinos e o contato direto das células do trato gastrointestinal com os nutrientes (1,4,5). As células L intestinais estão localizadas ao longo do epitélio intestinal, sendo predominantes no íleo e cólon, entrando em contato diretamente com os nutrientes que chegam ao lúmen intestinal pela superfície apical e com os vasos sanguíneos e fibras nervosas pela superfície basolateral. A resposta secretória do GLP-1 à ingestão de glicose foi a primeira observada nos estudos deste peptídeo, porém esta secreção também é estimulada por outros nutrientes como gorduras e proteínas. Ademais, estudos demonstraram que a secreção de GLP-1 em resposta às dietas mistas é superior à resposta induzida somente por glicose (6,7). Durante o estado de jejum a concentração plasmática basal de GLP-1 varia entre 5-10 pmol, sendo que após a ingestão de alimentos a concentração deste peptídeo aumenta rapidamente (~50 pmol) (6). A secreção pós-prandial do GLP-1 ocorre em duas fases, sendo que a primeira ocorre aos 10-15 minutos e a segunda, mais longa, ocorre aos 30-60 minutos, após a ingestão dos alimentos. Nesta fase tardia da secreção do GLP-1 é encontrada a concentração máxima deste peptídeo no sangue (1).

Após ser secretado, o GLP-1 desempenha suas funções biológicas pela ligação ao seu receptor específico, o GLP-1R. Diversos estudos demonstraram que o GLP-1R possui ampla distribuição, sendo expresso não só nas células β pancreáticas, como também nas células α e δ das ilhotas de Langerhans, coração, estômago, intestino, rim, hipotálamo e pituitária (8–10). Devido a essa variedade de tecidos em que o GLP-1R encontra-se

expresso, sugere-se que este hormônio incretina exerça outras ações fisiológicas além do controle glicêmico.

O GLP-1R é um receptor de aproximadamente 64 kDa, pertencente à família dos receptores de membrana associados à proteína G (GPCR) e sua estrutura é composta por um domínio extracelular amino-terminal longo que se liga a sete domínios transmembrânicos (11). Quando o GLP-1 se liga ao GLP-1R, ocorre a ativação da proteína G estimulatória (G α s), com consequente ativação da adenilil ciclase, que catalisa a formação da adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc) a partir do ATP. Esse aumento nos níveis intracelulares de AMPc ativa as vias de sinalização da proteína diretamente ativada por AMPc (EPAC) e da proteína cinase A (PKA) (12) (Figura 2).

Figura 2. Representação da ligação GLP-1/GLP-1R e as principais vias de sinalização deflagradas. O GLP-1 ao se ligar ao seu receptor, o GLP-1R, acoplado à proteína G estimulatória (subunidade α), promove a ativação da adenilil ciclase (AC) que

catalisa a formação de AMPc a partir do ATP e consequente ativação das vias de PKA e EPAC (Adaptado de Al-Sabah, 2015) (13).

A ativação do GLP-1R também ocorre com a interação deste receptor com agonistas, como o exendin-4 e exenatide (14), desencadeando toda a cascata de sinalização e promovendo as funções biológicas, comumente observadas em resposta ao GLP-1. Entretanto, este receptor também possui afinidade por uma versão truncada do exendin-4, denominado exendin-9 (15). Este último se comporta como um antagonista específico, inibindo competitivamente o sítio de ligação do GLP-1R.

1.1.2. Papel na homeostase glicêmica e *Diabetes Mellitus* do tipo 2

O GLP-1 foi descrito e estudado devido ao seu potencial sobre a homeostase glicêmica, sendo responsável pela potencialização da secreção de insulina em períodos pós-prandiais (efeito incretina). Essa ação ocorre devido aos efeitos deste peptídeo sobre as células- β pancreáticas, responsáveis pela secreção de insulina, mediada por ativação das vias da PKA e EPAC (16).

Essas vias de sinalização são ativadas devido ao aumento intracelular de AMPc e culminam em um influxo de Ca^{+} através dos canais dependentes de voltagem, consequente despolarização da membrana plasmática das células- β pancreáticas, fusão de vesículas contendo insulina com a membrana plasmática e secreção de insulina (17). A atuação da PKA ocorre via inibição de canais de K^{+} sensíveis ao ATP (K_{ATP}) (18), enquanto a EPAC 2 (principal isoforma de EPAC expressa em células- β pancreáticas) atua na exocitose de vesículas de insulina através da regulação da proteína 1 relacionada ao Ras (Rap1) pela fosfolipase-C (19). Ademais, o GLP-1 age também aumentando a biossíntese de insulina através do aumento da transcrição e estabilidade do RNAm,

proporcionando uma recuperação dos estoques de insulina após o primeiro estímulo e consequente liberação desses grânulos pelas células- β pancreáticas (20,21). Nas células- α pancreáticas, a inibição da secreção do glucagon ocorre por ação direta da ativação dos receptores de GLP-1 ou indireta por meio da estimulação da secreção da insulina e da somostatina (22–24). Tais ações culminam em uma maior captação de glicose pelo tecido muscular esquelético e menor síntese de glicose pelo fígado.

O GLP-1 também contribui para o controle glicêmico reduzindo a motilidade do trato gastrointestinal (TGI) e promovendo sensação de saciedade (25). Além disso, este peptídeo e seus análogos melhoram a sensibilidade à glicose das células- β pancreáticas (26), reduzem apoptose (27) e promovem aumento da proliferação e neogênese dessas células (28,29). A importância das ações do GLP-1 no controle glicêmico foi ratificada em estudos com antagonista do GLP-1R, exendin-9, em que verificaram redução da secreção pós-prandial de insulina e prejuízo do controle glicêmico (30–32).

Pacientes com *Diabetes Mellitus* do tipo 2 (DM2) apresentam redução do efeito incretina (33) (Figura 3) e este achado explica, em parte, o prejuízo da secreção de insulina nestes pacientes, bem como o descontrole glicêmico evidenciado por hiperglicemia pós-prandial. É válido mencionar que o GLP-1 não é o único envolvido nesta resposta do TGI conhecida como efeito incretina, entretanto, sua contribuição para tal é extremamente significativa. Devido ao seu potencial sobre o efeito incretina e consequente potencialização da secreção de insulina, sem induzir a hipoglicemia, o GLP-1 se tornou um alvo para o desenvolvimento de terapias para o tratamento da DM2.

Figura 3. Efeito incretina em indivíduos saudáveis e diabéticos. Secreção de insulina em resposta à administração de glicose via oral (linha verde) é superior à secreção de insulina em resposta à infusão endovenosa de glicose (linha vermelha) em indivíduos saudáveis. Esse fenômeno é denominado efeito incretina e é evidenciado pela área azul do gráfico A. Por sua vez, a secreção de insulina em resposta à ingestão de glicose (linha verde) em indivíduos acometidos pelo DM2 se apresenta prejudicada (área azul diminuída do gráfico B) (Adaptado de Nauck *et al.*, 1986) (33).

1.1.3. Degradação enzimática pela dipeptidil peptidase IV e desenvolvimento das terapias baseadas em incretina

O grande problema do uso do GLP-1 como terapia para a DM2 é decorrente de sua instabilidade metabólica, meia-vida de aproximadamente dois minutos, devido a sua rápida degradação proteolítica pela DPPIV. Esta enzima cliva o GLP-1 ativo (7-36), transformando-o em sua forma inativa, o GLP-1 (9-36), sendo que uma significativa proporção do GLP-1 recém-secretado nem chega a alcançar a circulação sistêmica (34,35). Deste modo, foram desenvolvidas estratégias terapêuticas denominadas “baseadas em incretinas” constituídas pela administração de inibidores da DPPIV, as

gliptinas, bem como os incretinomiméticos, que são os análogos do GLP-1 e agonistas do GLP-1R (36) (Figura 4).

Figura 4. Representação da degradação enzimática do GLP-1 pela DPP-IV e mecanismo de ação das terapias baseadas em incretina. À esquerda está a representação da DPP-IV clivando o GLP-1 humano no aminoácido alanina, transformando o GLP-1 7-36 em GLP-1 9-36. No centro está representado o mecanismo de ação dos incretinomiméticos, que possuem afinidade pelo GLP-1R e ativam a cascata de sinalização originalmente realizada pelo GLP-1 endógeno, porém com resistência a clivagem pela DPP-IV graças à modificação estrutural no segundo aminoácido a partir da região N-terminal – troca de uma alanina por uma glicina. À direita está representado o mecanismo de ação de forma genérica dos inibidores da DPP-IV, que permite o aumento da meia vida dos substratos da DPP-IV.

1.1.3.1. Inibidores da DPP-IV

Os inibidores da DPP-IV (Tabela 1) são fármacos administrados por via oral que desempenham papel na inibição da atividade catalítica desta enzima, aumentando a meia-

vida das incretinas. A inibição farmacológica da DPPIV ganhou espaço no tratamento do DM2, sendo que atualmente, um número de moléculas pertencentes à classe das gliptinas foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) e são comercializados. Esses inibidores possuem vantagens sobre outros tratamentos para diabetes por apresentarem um menor risco de hipoglicemia e por não provocarem ganho de peso durante o tratamento (37).

Tabela 1. Inibidores da DPPIV disponíveis atualmente para uso sob prescrição médica.

Inibidores	Nome comercial	Dose	Tempo de meia-vida (h)
Sitagliptina	Januvia®	100 mg 1 x/dia	12
Vildagliptina	Galvus®	50 mg 2x/dia	3
Saxagliptina	Onglyza®/Suiny®	5 mg 1x/dia	2
Alogliptina	Nesina®	25 mg 1x/dia	21
Linagliptina	Trajenta®	5 mg 1x/dia	10

Fonte: (38–42).

1.1.3.2. Incretinomiméticos

Os incretinomiméticos (Tabela 2) são fármacos administrados por via subcutânea por serem peptídeos, já que administração oral inviabilizaria sua ação. Os efeitos destes agentes ocorrem em decorrência da sua ligação e consequente ativação do GLP-1R. Atualmente existem cinco representantes desta classe que são utilizados para o tratamento da DM2, sendo que recentemente a dose subcutânea de 3,0 mg uma vez ao dia do liraglutide foi liberada pela FDA para o tratamento de obesidade (43,44). Estas drogas foram classificadas de acordo com suas diferenças estruturais que influenciam diretamente o tempo de meia vida da droga e a dose necessária a ser administrada.

Tabela 2. Incretinomiméticos disponíveis atualmente para uso sob prescrição médica.

Incretinomiméticos	Nome comercial	Dose	Tempo de meia-vida
Exenatida	Byetta [®]	5-10 µg 2x/dia	4h
Exenatida (Liberação prolongada)	Bydureon [®]	2 mg 1 x/semana	2 semanas
Liraglutida	Victoza [®]	0,6-1,8 mg 1 x/dia	13h
Lixisenatida	Lyxumia [®]	20 µg 1 x/dia	3h
Albiglutida	Eperzan [®]	30-50 mg 1 x/semana	5 dias
Dulaglutida	Trulicity [®]	0,75-1,5 mg 1x/dia	4 dias

Fonte: (43–50).

1.2. Efeitos extraglicêmicos do GLP-1

Como já mencionado anteriormente, o GLP-1R é expresso em diversos tecidos (8,10) e estes achados sugerem que o agonismo deste receptor exerça ações fisiológicas para além do controle glicêmico. Estudos com agonistas do GLP-1R demonstram que a ativação deste receptor está vinculada a mudanças na função dos tecidos em que este se encontra expresso, incluindo efeitos antioxidantes, anti-apoptóticos e anti-inflamatórios. Além disso, estudos com estes agonistas demonstraram efeitos benéficos sobre função cardíaca, renal, metabolismo de lipídeos e redução do ganho de peso de forma independente da melhora glicêmica (Figura 5).

Figura 5. Resumo esquematizado dos efeitos pleiotrópicos do GLP-1. Esquema dos efeitos pleiotrópicos do GLP-1 devido à ampla distribuição do GLP-1R. No centro está representada a estrutura dos incretinomiméticos disponíveis para uso e aprovados pela FDA e perifericamente estão os órgãos e os efeitos mediados pelo GLP-1 endógeno e agonistas do GLP-1R. TGI: trato gastrointestinal; PA: pressão arterial; FC: frequência cardíaca; NO: óxido nítrico (Adaptado de Ussher e Drucker, 2014) (51).

No TGI, o GLP-1 participa de um fenômeno denominado “freio ileal”, em que os nutrientes presentes na parte distal do intestino delgado induzem uma redução da motilidade intestinal na parte superior do TGI e de sua atividade secretora. Como consequência, ocorre um retardamento do esvaziamento gástrico reduzindo a entrada de glicose para a circulação sistêmica no período pós-prandial (52). Esta propriedade do GLP-1 é tão importante quanto o efeito incretina (25,53).

No cérebro, o GLP-1R se encontra expresso em regiões responsáveis pela regulação da ingestão de alimentos (54). Os agonistas do GLP-1R atuam predominantemente sobre

o hipotálamo onde exercem efeitos nos neurônios do núcleo arqueado e, desta forma, reduzem a sinalização da fome e garantem saciedade. Em estudos com indivíduos saudáveis que receberam administração endovenosa de GLP-1 (50 pmol/kg/h), foi observado aumento na sensação de saciedade, acompanhado por redução na ingestão de alimentos (55). Ademais, estudos com primatas e roedores saudáveis e diabéticos demonstraram uma relevante redução na ingestão de alimentos e um menor ganho de peso nestes modelos animais que receberam a administração sistêmica de GLP-1 (56).

Em tecido cardíaco, o GLP-1 parece ter efeito benéfico sobre a função do miocárdio, desempenhando ações cardioprotetoras. Entre os efeitos cardioprotetores deste peptídeo estão a redução da apoptose de cardiomiócitos através da ativação de vias citoprotetoras, redução do tamanho do infarto e ações vasodilatadoras atuando na melhora do fluxo coronariano (57–59). Ademais, estudos demonstraram que o uso prolongado dos agonistas do GLP-1R está associado a uma redução do peso corpóreo proporcionado por redução da gordura visceral e subcutânea, redução dos valores de triglicérides e melhora no metabolismo dos lipídeos e aumento dos níveis de lipoproteínas de alta densidade (HDL) (44,60), o que pode contribuir para esta cardioproteção por reduzir os fatores de risco para doenças cardiovasculares.

Em vasos, o GLP-1 promove vasoproteção mediada por diferentes efeitos deste peptídeo na vasculatura, incluindo o aumento da produção de óxido nítrico (NO), por meio da ativação da NO sintase endotelial (eNOS) e o aumento dos níveis de AMPc em células musculares lisas (61,62).

Em rim, os efeitos dos agonistas do GLP-1R, bem como os inibidores da DPP-IV, promovem renoproteção através da redução de proteinúria, esclerose tubular, estresse

oxidativo e inflamação (63,64). Além disso, diversos estudos têm demonstrado as propriedades natriuréticas e diuréticas resultante da infusão sistêmica de GLP-1 (65–68).

1.2.1. Efeitos renais do GLP-1

O primeiro relato de que a administração exógena de GLP-1 induzia natriurese e diurese ocorreu em 1996 (69). Anos mais tarde, estes efeitos foram também observados em seres humanos e diversos modelos experimentais diabéticos e não diabéticos (65,67,70). Em um destes estudos onde tais efeitos foram constatados, verificou-se que a infusão intravenosa de GLP-1 durante três horas em indivíduos saudáveis e obesos aumentou o fluxo urinário, excreção de sódio e redução da excreção de hidrogênio (65). Tais dados sugeriam que possivelmente parte das ações natriuréticas e diuréticas do GLP-1 poderiam ocorrer mediada pela inibição da atividade da isoforma 3 do trocador de sódio e hidrogênio (NHE3) em túbulo proximal renal.

Nosso grupo de pesquisa validou esta hipótese ao demonstrar redução da atividade do NHE3 em túbulo proximal perfundido com GLP-1 (20 nM), utilizando a técnica de microperfusão estacionária *in vivo* (68). Neste mesmo trabalho nosso grupo constatou também que a inibição da atividade deste trocador mediada pelo GLP-1 foi acompanhada por aumento nos níveis de fosforilação dos resíduos 552 e 605 (sítios consensos para PKA) presentes na cauda citoplasmática do NHE3. O envolvimento da via do AMPc/PKA mediando os efeitos natriuréticos e diuréticos da inibição da atividade do NHE3 foram comprovados utilizando inibidores de PKA e adenilil ciclase. Ademais, foi avaliada a contribuição da via da EPAC, uma das vias ativadas pelo complexo GLP-1/GLP-1R, entretanto, não foi observada participação desta via no rim. Estas hipóteses foram testadas, através da técnica de microperfusão estacionária *in vivo* utilizando

inibidores de PKA e EPAC. Ademais, os efeitos inibitórios sobre a atividade do NHE3 também são observados quando são administrados inibidores da DPPIV. Isso pode ocorrer em parte por aumentar a biodisponibilidade do GLP-1 ativo, sendo uma das possíveis explicações para o achado da interação funcional entre o NHE3 e a DPPIV proposto pela Prof^a Dr^a Adriana Girardi (71,72).

O agonismo do GLP-1R também é capaz de modular a função renal através da regulação hemodinâmica. Estudos com roedores demonstraram que a infusão sistêmica do GLP-1 está associada às alterações na hemodinâmica renal por aumentar o fluxo plasmático renal e o ritmo de filtração glomerular (RFG) (67,68). O GLP-1 aumenta o RFG por meio de uma diminuição da resistência vascular renal. Esses efeitos hemodinâmicos renais do GLP-1 são mediados via AMPc, já que a infusão do GLP-1 com inibidor da AC, bloqueia completamente estes mecanismos e efeitos (73).

Tendo em vista esses efeitos sobre a resistência vascular renal, nosso grupo testou a hipótese de que o GLP-1 é capaz de promover vasodilatação em leito renal. Esses experimentos forneceram ao grupo um indício de que o GLP-1 é capaz de promover dilatação da vasculatura renal. Além disso, este efeito não ocorre por um mecanismo dependente do endotélio, já que foi observado mesmo quando se retira o endotélio da vasculatura renal ou se administra N (w)-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), um inibidor específico da eNOS (73).

Corroborando com nossos dados (73), Jensen e colaboradores (74) demonstraram que o GLP-1 exerce efeitos diretos sobre a resistência vascular renal, modulando a resistência pré-glomerular, entretanto, utilizando células vasculares lisas das arteríolas aferentes. Neste estudo, foi observado que a vasodilatação mediada pela ativação do GLP-

1R promovia um aumento do fluxo sanguíneo renal e do RFG. Vale ressaltar que em humanos não ocorrem os efeitos hemodinâmicos observados em roedores e outros modelos experimentais. Entretanto, a infusão do GLP-1 provoca a inibição do NHE3, evidenciada por aumento da excreção de sódio, alcalinização da urina e aumento do clearance do lítio.

1.2.1.1. Efeitos endógenos do GLP-1 sobre o rim

Até o momento, os estudos que investigaram os efeitos do GLP-1 eram realizados utilizando doses suprafisiológicas deste peptídeo ou então agonistas do GLP-1R. Embora estes estudos tenham demonstrado os efeitos natriuréticos, diuréticos e vasoativos do GLP-1 em rim, nenhum deles constatou os efeitos endógenos deste peptídeo sobre o manuseio renal de sal e água. Desta forma, nosso grupo de pesquisa foi pioneiro em demonstrar tais efeitos a partir da infusão do antagonista específico do GLP-1R, exendin-9 (75).

Neste estudo (75), demonstrou-se que o GLP-1 endógeno possui efeito sobre o NHE3. Entre os achados observados, constatou-se que a infusão do exendin-9 aumenta a atividade do NHE3, sugerindo que o GLP-1 também tem um papel fisiológico não somente na homeostase glicêmica, como também na homeostase volêmica. Para se certificar de que estava ocorrendo a ligação GLP-1/GLP-1R no rim foram realizados experimentos dosando o AMPc na urina desses ratos em que foi constatado menos AMPc sendo excretado no grupo infundido com exendin-9. Em somatória a esse experimento, avaliou-se também o nível de fosforilação dos resíduos serina e treonina fosforilados por PKA, em que se constatarem menores níveis de fosforilação. Ademais, a infusão do exendin-9 foi capaz de reduzir o fluxo urinário, carga excretada de sódio, RFG, pH

urinário e o clearance de lítio. Em conjunto os dados permitiram concluir que o grupo infundido com o antagonista específico apresentava efeitos antinatriuréticos e antidiuréticos, contribuindo fortemente para maior reabsorção de sódio em túbulo proximal.

Além desses experimentos, foram realizadas análises de microperfusão estacionária *in vivo* para avaliar a atividade do NHE3, entretanto, não foram observadas diferenças de atividade entre os grupos exendin-9 e salina. Sabendo que o GLP-1 é sintetizado e secretado somente no intestino e cérebro, era natural não observar efeito na atividade do NHE3, já que durante o experimento de microperfusão ocorre a interrupção do fluxo tubular e ocorre a adição da solução perfusora de interesse. Assim, foi necessária a infusão do GLP-1 juntamente com o exendin-9 em um novo grupo e a infusão somente do GLP-1 em outro. Desta forma, se observou a resposta inibitória do NHE3 em resposta ao GLP-1, enquanto esta foi bloqueada na infusão combinada de GLP-1 e exendin-9. Em conjunto, estes dados demonstram que os efeitos, natriurético e diurético, do GLP-1 são mediados, em parte, por meio da inibição da atividade do NHE3 em túbulo proximal e que a sinalização basal do GLP-1 contribui para a manutenção da homeostase volêmica, regulando o balanço de sal e água.

1.2.2. Efeitos anti-hipertensivos do GLP-1

Além dos efeitos extra glicêmicos já mencionados, em 2003, Yu e colaboradores (76) demonstraram pela primeira vez que o GLP-1 tem ação anti-hipertensiva em ratos Dahl salt, sensíveis ao sal. Neste estudo foi mostrado que a infusão crônica de GLP-1 em ratos submetidos à dieta rica em sal atenuou o aumento da pressão arterial (PA). Eles atribuíram isso a uma melhora no manuseio renal de sal e água e também às propriedades

vasodilatadoras do GLP-1. Resultados semelhantes foram observados por Kunio Hirata e colaboradores em que se observou resposta anti-hipertensiva do tratamento com exendin-4 em camundongos infundidos cronicamente com angiotensina II (Ang II) (77).

Este efeito anti-hipertensivo não foi observado somente em modelos experimentais, há um amplo acervo de ensaios clínicos que comparam os efeitos dos agonistas do GLP-1R a outras terapias. Em pacientes diabéticos observa-se diminuição dos níveis pressóricos entre 5-8 mmHg, sendo que, o tratamento com os agonistas do GLP-1R, liraglutida e exenatida foi capaz de reduzir a PA não somente nestes pacientes diabéticos, como também não diabéticos (78,79). Em um estudo desenvolvido em Tanno e Sobetsu, duas cidades japonesas, foi observado que a secreção de GLP-1 pós-prandial na população em geral tinha uma correlação negativa com a pressão arterial sistólica (PAS). Ou seja, quanto menor a secreção de GLP-1 pós-prandial, maiores os níveis de pressão sistólica encontrada na população (80). Ademais, esta correlação não foi observada com relação à pressão arterial diastólica (PAD).

1.2.2.1. O papel do rim na gênese e manutenção da Hipertensão arterial

A hipertensão arterial (HA) é uma doença crônica caracterizada pelos níveis elevados da pressão sanguínea nas artérias. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), essa doença afeta aproximadamente 25% da população mundial adulta, sendo predito que a sua prevalência aumente para 60% em 2025, acometendo, assim, cerca de 2,64 bilhões de pessoas. A HA é considerada um dos principais fatores de risco para doenças cardiovasculares, as quais são responsáveis por cerca de 31% das mortes mundialmente (81).

Esta pode ser classificada como primária ou secundária. A hipertensão primária - também conhecida como hipertensão essencial ou idiopática - é uma forma de hipertensão multifatorial sem causa atribuível ou identificável e representa 90% dos casos (82). Esta é caracterizada por uma PAS crônica superior a 130 mmHg e uma PAD superior a 80 mmHg em indivíduos adultos (83). Já a hipertensão secundária envolve tipos mais raros, manifestando-se como consequência de algumas doenças tais como doença renal crônica (DRC), estenose da artéria renal, aldosteronismo primário, entre outras.

A hipertensão primária é ainda hoje uma incógnita. Não existe uma única etiologia e a variação de fenótipos entre os pacientes com esta doença é realmente grande, o que dificulta um diagnóstico preciso e assertivo. Geralmente o que ocorre na clínica é a administração de drogas com diferentes mecanismos de ação e alvos, que tentam, muitas vezes em conjunto, conter o aumento da pressão arterial. A complexidade envolvida com a hipertensão se inicia basicamente em sua regulação, que constitui um dos processos mais intrincados do organismo, havendo a integração de vários sistemas como o nervoso, renal, cardiovascular e endócrino.

A resposta rápida a alterações da PA provém dos barorreceptores e quimiorreceptores arteriais, evitando flutuações bruscas da PA sob situações corriqueiras como alteração de posição e estresse. Em sequência existe a regulação em médio prazo, onde as propriedades mecânicas dos vasos atuam a fim de acomodar seu diâmetro e/ou estiramento às alterações do fluxo sanguíneo. Entretanto, em longo prazo, são os rins que atuam efetivamente regulando a PA, a partir do controle da excreção de sal em resposta a mudanças na perfusão renal, que se assemelha a PA sistêmica, por meio do mecanismo denominado natriurese pressórica (84). Neste mecanismo se destaca a importância dos

hormônios vasoativos, natriuréticos e antinatriuréticos como Ang II, aldosterona, NO, insulina e outros (Figura 6).

Figura 6. Representação gráfica das respostas de rápido, médio e longo prazo frente ao estímulo de alteração da PA. No gráfico encontra-se a potência máxima dos mecanismos de controle da PA em relação a diferentes intervalos de tempo. (Adaptado de Guyton, 1980) (85).

Tão complexo quanto a regulação dos níveis de PA, são os mecanismos que levam ao desenvolvimento e manutenção da HA. Neste contexto existem duas teorias sobre a gênese da HA no indivíduo, sendo ela a neurogênica e a renal. Nesta primeira vemos o sistema nervoso central (SNC) como o principal responsável pelo desenvolvimento da doença já que o ponto de ajuste da PA encontra-se naturalmente elevado em relação ao parâmetro considerado como normal. Embora seja indiscutível o papel do SNC na regulação da PA, existem estudos que demonstram que este sistema não atua em longo

prazo sobre a PA, já que existe a adaptação dos barorreceptores ao novo valor de PA como referência. Em um estudo com deservação dos receptores carotídeos e aórticos, foi observado maiores flutuações da PA em resposta aos estresses normais da circulação como, por exemplo, mudança de posição (86). Ademais, os animais submetidos a este procedimento não desenvolveram HA. Por outro lado, a outra teoria de gênese da HA, também conhecida com Guytoniana, defende que o rim é o principal órgão envolvido no processo de regulação da PA em longo prazo, sendo que a incapacidade de excretar sódio a uma taxa necessária em resposta a alterações no organismo é o responsável pelo desenvolvimento da HA (87).

Esta regulação em longo prazo da PA pelos rins ocorre em resposta às alterações da própria PA. Aqui se destaca a importância do mecanismo de natriurese pressórica que consiste na resposta do rim as variações da pressão de perfusão renal, culminando em alteração na excreção de sódio pelo organismo. Na figura 7, logo abaixo, podemos observar a resposta renal sob duas condições.

Figura 7. Mecanismo de natriurese pressórica. A linha pontilhada azul representa a linha da natriurese pressórica. As linhas inteiriças vermelha e verde representam a taxa

de excreção de sódio. O círculo preto representa o ponto de equilíbrio, resultante da intersecção da linha de natriurese pressórica e da linha da taxa de excreção de sódio, sendo este o determinante do valor de PA (Adaptado de Fisiopatologia renal, 2002) (84).

Note que a linha vermelha ao intersectar a linha de natriurese pressórica resulta em um ponto de equilíbrio diferente do ponto de intersecção entre a linha verde e a linha da natriurese pressórica. Isto porque em condições normais, para a excreção de 100 mEq/dia de sódio é necessária uma pressão de perfusão renal de aproximadamente 90 mmHg. Entretanto, se ocorrer um aumento de PA para 100 mmHg, o ponto de equilíbrio irá se deslocar ao longo da linha de natriurese pressórica aumentando a taxa de excreção de sódio a fim de regular a PA. Desta forma, naturalmente o mecanismo de natriurese pressórica mantém os valores de PA constante à custa de uma regulação fina e adequada da excreção de sódio. Embora esse mecanismo regule a PA adequadamente, é possível ocorrer a perturbação deste, resultando em inclinação desta reta azul da natriurese pressórica (Figura 8). Logo abaixo estão exemplificadas duas situações em que o rim está apresentando um déficit na capacidade de excretar o sódio (84).

Figura 8. Situações em que a natriurese pressórica encontra-se alterada e promove hipertensão. A linha azul pontilhada representa a linha de natriurese pressórica sob

condições normais. A linha inteiriça verde água representa a inclinação da linha de natriurese pressórica. A linha vermelha representa a taxa de excreção de sódio. Note que nas duas situações o ponto de equilíbrio encontra-se deslocado em relação a linha de natriurese pressórica em condições normais. A-representação de hipertensão sal-sensível e B-representação de hipertensão sal-resistente (Adaptado de Fisiopatologia renal, 2002) (84).

No gráfico A, vemos uma inclinação da reta azul, representado pela reta verde. O rim nesta situação apresenta uma incapacidade de excretar a quantidade de sódio ingerida com o valor de perfusão renal normal. Este acúmulo do íon sódio promove esta inclinação, pois será necessária uma PA maior para se excretar a mesma quantidade de sódio ingerida. Isso ocorre em casos de hipertensão chamada sal-sensível, em que o controle do sal na dieta é capaz de proporcionar redução dos valores de PA e retorno do ponto de equilíbrio para o nível adequado. Em contraste, o gráfico B representa a condição denominada hipertensão sal resistente, em que os valores de referência da reta de natriurese pressórica e o ponto de equilíbrio são naturalmente diferentes. Podemos ver que a reta verde (representando a linha de natriurese pressórica em indivíduos com hipertensão sal resistente) é paralela à linha de natriurese pressórica pontilhada azul (representando o mecanismo em indivíduos normais), entretanto a linha verde encontra-se deslocada para a direita, o que significa que este indivíduo terá que apresentar valores de PA maiores para excretar a mesma quantidade de sódio ingerida por um indivíduo normal (84).

Desta forma, concluímos que a PA é regulada em longo prazo pelo rim, devido a propriedades intrínsecas deste órgão, que modulam a excreção de sódio. Por sua vez, a excreção de sódio é regulada finamente por transportadores de sódio presentes ao longo do néfron – estrutura funcional do rim. Esses transportadores regulam o balanço deste íon

e consequentemente água, assim, alterações no número ou atividade destes, podem afetar diretamente o volume extracelular e consequentemente a pressão arterial.

1.2.3. Manuseio renal de sódio na HA: papel do NHE3

O túbulo proximal é o primeiro segmento do néfron a iniciar o processo de reabsorção de sódio. Neste segmento destaca-se a importância do NHE3, que é responsável por dois terços da reabsorção deste íon nesta porção do néfron (88). O NHE3 é a isoforma 3 de uma família de trocadores de sódio e hidrogênio que se encontra expresso em membrana apical de células epiteliais renais e gastrointestinais (89,90). Em tecido renal, o NHE3 está presente em túbulo proximal (TP) e no segmento ascendente da alça de Henle (91).

Na figura 9, está representado o transporte de sódio pelo NHE3. Neste processo, ocorre a reabsorção de um sódio para o interior da célula do túbulo proximal e a secreção de um hidrogênio para o lúmen, através da membrana apical. Ademais, a secreção de um hidrogênio culmina na reabsorção indireta de um bicarbonato (HCO_3^-). O hidrogênio após ser secretado para o fluido tubular reage com o HCO_3^- formando o ácido carbônico (H_2CO_3), o qual posteriormente é dissociado em H_2O e CO_2 pela ação da isoforma IV da anidrase carbônica (AC IV). O CO_2 provindo da dissociação se difunde passivamente pela membrana apical da célula e reage novamente com uma molécula de água, formando o H_2CO_3 . Essa reação ocorre no citoplasma da célula e é catalisada pela isoforma II da anidrase carbônica (AC II), sendo seguida pela dissociação do H_2CO_3 em hidrogênio e HCO_3^- . O HCO_3^- formado retorna ao sangue pela ação do cotransportador de sódio bicarbonato (NBCe1) presente em membrana basolateral, enquanto que o hidrogênio é secretado para o lúmen pela ação do NHE3, reiniciando o ciclo (92).

Figura 9. Reabsorção de sódio mediada pelo NHE3 em túbulo proximal renal. O esquema representa o mecanismo de reabsorção de sódio pelo NHE3. Isoforma 3 do trocador de sódio e hidrogênio (NHE3); sódio (Na^+); hidrogênio (H^+); água (H_2O); gás carbônico (CO_2); bicarbonato (HCO_3^-); ácido carbônico (H_2CO_3); isoforma 2 da anidrase carbônica (AC II); isoforma IV da anidrase carbônica (AC IV); cotransportador de sódio bicarbonato (NBCe1) (Adaptado de Boron e Boulpaep, 2012) (92).

A importância deste trocador na reabsorção de sódio e consequentemente sob a regulação da PA foi evidenciada em camundongos nocaute para este transportador. Quando os camundongos foram submetidos a uma dieta normossódica, estes apresentaram hipotensão e quadro moderado de acidose metabólica (93). Entretanto, quando foram submetidos a uma dieta hipossódica morreram por choque hipovolêmico dentro de poucos dias (94). Neste nocaute, a carga de sódio que chega em túbulo distal é maior e adaptações são necessárias para reabsorver o novo volume de íon e fluido que chega nesta região mais distal do néfron (95). Entre as adaptações que ocorrem estão: ativação do SRA, alteração da expressão de transportadores de sódio distais e diminuição do RFG em decorrência da ativação do feedback túbulo glomerular.

Frente à importância do NHE3 sobre a reabsorção de sódio e manutenção do volume extracelular e PA, variações na atividade deste trocador podem contribuir fortemente para expansão do volume no caso de retenção de sódio, bem como redução considerável na volemia em caso de um nocaute. Neste quesito, diversos estudos demonstraram que a atividade do NHE3 pode ser modulada direta e indiretamente via fosforilações na porção citoplasmática do trocador e por mecanismos ainda pouco elucidados – por exemplo: regulação por insulina -, bem como por ação direta por interação com outras proteínas.

O NHE3 possui um domínio transmembrânico, N-terminal, responsável pela função transportadora que permuta sódio e hidrogênio e um domínio citoplasmático, C-terminal, onde ocorre a modulação deste trocador (96,97) (Figura 10). A modulação da atividade do NHE3 pode envolver alterações transcricionais, alterando a expressão proteica total deste trocador, bem como por modificações pós traducionais via fosforilação de resíduos presentes na cauda citoplasmática do domínio C-terminal (98), translocação do NHE3 entre os microdomínios da célula do TP e via interação com outras proteínas como a DPPIV (71).

Figura 10. Representação do NHE3 presente em túbulo proximal renal. O esquema apresenta a estrutura do trocador NHE3, com o domínio N-terminal responsável pela permutação de um íon sódio e um hidrogênio e o domínio C-terminal em que estão presentes sítios regulatórios suscetíveis às fosforilações via PKA. Ser: serina.

Os primeiros estudos desenvolvidos com intuito de investigar o papel fisiológico da interação do NHE3 com a DPPIV foram realizados utilizando cultura de células OKP (*Oppossum Kidney clone P*) tratadas com um inibidor específico da DPPIV, denominado P32/98 (99). Neste estudo, constatou-se que a presença do P32/98 exerce efeito inibitório sobre a atividade do NHE3 *in vitro*. Posteriormente, outro estudo (72) demonstrou utilizando ratos *Wistar* tratados com um inibidor competitivo da DPPIV *in vivo*, que sua inibição também inibia a atividade do NHE3. Diante destes achados a Prof^a Dr^a Adriana Girardi propôs a hipótese de que a enzima DPPIV poderia estar degradando algum peptídeo que tivesse ação sobre o NHE3, inibindo assim sua atividade. A literatura fornecia um forte acervo teórico que sugeria o GLP-1 como sendo este peptídeo (65,67,69).

Alguns anos mais tarde, nosso grupo de pesquisa demonstrou que o GLP-1 pode regular a atividade do NHE3 via ativação do complexo GLP-1/GLP-1R, ativação de adenilil ciclase, aumento de AMPc e ativação de PKA. Esta cinase, por sua vez, fosforila o resíduo de serina 552 da cauda citoplasmática do NHE3, promovendo sua inibição (68). Entretanto, é importante mencionar que possam existir outros peptídeos que também são substratos da DPPIV e promovam natriurese, visto que em cultura de células OKP a inibição da DPPIV também resulta na inibição do NHE3 e é sabido que o túbulo proximal não sintetiza GLP-1 (99). Em somatória a isto, estudos com camundongos nocaute para o GLP-1R tratados com alogliptina, um inibidor da DPPIV, apresentam natriurese e diurese (100).

1.3. Hipótese do estudo

Nosso grupo foi o primeiro a demonstrar o efeito endógeno do GLP-1 no rim. Agudamente, o bloqueio da sinalização endógena do GLP-1R demonstrou efeitos antinatriuréticos e antidiuréticos, sugerindo que este peptídeo, primariamente envolvido com a homeostase glicêmica, também desempenha importante papel na regulação de sódio no organismo mediado pela inibição do NHE3 via fosforilação da serina 552. Entretanto, a resposta do bloqueio em longo prazo da sinalização endógena do GLP-1R sobre manuseio renal de sódio e, conseqüentemente, sua influência sobre a regulação da PA permanecem desconhecidos. Desta forma, testamos a hipótese de que o antagonismo prolongado do GLP-1R é capaz de elevar os níveis pressóricos em ratos *SHR* e *Wistar*.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral:

Testar a hipótese de que o bloqueio em longo prazo do GLP-1R altera os níveis pressóricos em ratos hipertensos (*SHR*) e normotensos (*Wistar*) e investigar os mecanismos subjacentes.

2.2. Objetivos específicos:

- 2.2.1. Testar a hipótese de que o bloqueio em longo prazo do GLP-1R intensifica o aumento dos níveis pressóricos em *SHR* e aumenta a PA de *Wistar*;
- 2.2.2. Testar a hipótese de que o bloqueio em longo prazo do GLP-1R intensifica o desenvolvimento de dano renal em *SHR* e promove dano renal em *Wistar*;
- 2.2.3. Testar a hipótese de que o bloqueio em longo prazo do GLP-1R diminui os níveis de fosforilação na serina 552 do NHE3 em túbulo proximal em *SHR* e *Wistar*;
- 2.2.4. Testar a hipótese de que o bloqueio em longo prazo do GLP-1R aumenta a atividade do SRA intrarrenal em *SHR* e promove ativação do SRA intrarrenal em *Wistar*;
- 2.2.5. Testar a hipótese de que o bloqueio em longo prazo do GLP-1R reduz a sensibilidade à insulina e promove hiperinsulinemia em *SHR* e *Wistar*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Reagentes – peptídeos exendin-9 e exenatide

Os peptídeos utilizados neste estudo foram importados pela representante no Brasil, Nova Analítica®, diretamente da empresa *Abcam*®. Todo o procedimento de armazenamento e hidratação dos peptídeos liofilizados foram realizados de acordo com as instruções do fabricante.

3.2. Modelos experimentais

Todos os procedimentos executados foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP, sob o protocolo de pesquisa 915/2017 (*SHR*) e 042/2017 (*Wistar*). Os princípios éticos sugeridos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) foram seguidos rigorosamente.

Para o desenvolvimento deste estudo, foram utilizados ratos *SHR* e *Wistar* com cinco semanas de idade, comprados no Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e no biotério de produção de ratos do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (ICB), respectivamente. Os ratos foram mantidos no biotério do Instituto do Coração, Hospital das Clínicas (FMUSP), sob condições de controle de temperatura (22°C), de umidade (60%) e ciclo claro-escuro de 12 horas. Toda a maravalha e sabugo de milho em contato com os animais foram autoclavados, a água utilizada foi filtrada e a ração controlada da marca Nuvilab® CR-1. Não houve restrição do acesso à ração, com exceção nos períodos de jejum para a coleta de sangue e nas 8 horas que precedem a eutanásia.

O estudo foi conduzido de acordo com os desenhos experimentais ilustrados nas Figuras 11 e 12.

Os ratos *SHR* e *Wistar* foram divididos randomicamente em três grupos cada. A decisão de início do tratamento no 39º dia de idade foi tomada em decorrência das observações prévias do nosso grupo de pesquisa, em que constatamos que entre a 5ª e 6ª semana de idade, os ratos *SHR* encontram-se em fase pré-hipertensiva, apresentando balanço positivo de sódio. A partir desta idade os ratos tendem a apresentar um progressivo aumento da PA, sendo então a fase de interesse para o estudo em questão. Para os ratos *Wistar*, a escolha de início ao 39º dia foi com o propósito de seguir o mesmo protocolo desenvolvido anteriormente com os ratos *SHR*. O tratamento foi realizado via intraperitoneal (51,101), sendo duas aplicações diária com o antagonista, exendin-9 (37,5 ug/kg/12h), e o agonista, exenatide (5 ug/kg/12h), do GLP-1R. Os ratos *SHR* e *Wistar* controle receberam doses de 0,5 mL de solução salina (0,9% NaCl) duas vezes ao dia. Vale ressaltar que antes da randomização dos grupos e início do tratamento foram realizadas aferição da pressão arterial caudal e avaliação da função renal para caracterização das linhagens utilizadas no estudo e aquisição de dados basais dos ratos.

Foram realizadas coletas de sangue arterial antes do início do tratamento e no dia da eutanásia, via infraorbital e diretamente da artéria abdominal, repectivamente. O sangue foi coletado em tubos *BD Vacutainer*® SST Advance com gel separador e sem etilenodiaminotetracetato dissódico (EDTA), seguindo as instruções descritas pelo fabricante. Dentro de uma hora, o sangue foi centrifugado a 4000 RPM durante 20 minutos e o soro foi aliquoteado em microtubos e armazenado em freezer -80°C.

Figura 11. Desenho experimental para a linhagem *SHR*. Tratamento via intraperitoneal, com início no 39º dia de idade e duração de quatro semanas. Ctrl: controle, i.p.: intraperitoneal, GM: gaiola metabólica, PTMG: pletismografia, PA: pressão arterial, WB: *Western Blot*, IHQ: imunohistoquímica, ELISA: ensaio de imunoabsorção enzimática.

Figura 12. Desenho experimental para a linhagem *Wistar*. Tratamento via intraperitoneal, com início no 39º dia de idade e duração de quatro semanas. Ctrl: controle, i.p.: intraperitoneal, GM: gaiola metabólica, PTMG: pletismografia, PA: pressão arterial, WB: *Western Blot*, IHQ: imunohistoquímica, ELISA: ensaio de imunoabsorção enzimática.

3.3. Avaliação da função renal

Para monitoramento do consumo de água, ração e fluxo urinário, bem como, coleta de urina em 24 horas, foram realizadas gaiolas metabólicas antes do início do tratamento e na última semana do estudo. O protocolo consiste na adaptação dos ratos à gaiola por 48 horas, seguido por uma coleta de 24 horas. Para este experimento, os ratos foram alojados em gaiolas metabólicas com acesso a ração moída e peneirada e água. A urina é coletada com auxílio de um funil acoplado a um recipiente com óleo mineral na base, o que impede a evaporação da parte aquosa da urina coletada. Ao término das 24 horas, a urina é armazenada em tubo *Falcon*[®], centrifugada a 4000 RPM por 20 minutos, aliquoteada em microtubos e armazenada em freezer -20°C.

Com o material em mãos, foram realizados kits colorimétricos, análise de eletrólitos e ELISA. Os parâmetros de função renal que foram avaliados estão listados abaixo:

3.3.1. Fluxo urinário: a partir do volume urinário, o fluxo urinário foi obtido por gravimetria, isto é, pesando-se o volume urinário total coletado durante o intervalo de tempo (24 horas) e corrigindo este valor pelo peso do rato. Este parâmetro foi expresso em mL/kg/24h.

3.3.2. Ritmo de filtração glomerular: foi estimado através do clearance da creatinina e calculado pela fórmula $\frac{(Cr\ Ur * Fluxo\ Ur)}{Cr\ Sr}$, sendo *Cr Ur* correspondente à concentração urinária de creatinina, *Fluxo Ur* o fluxo urinário por minuto e *Cr Sr* a concentração sérica de creatinina. Os resultados foram expressos em mL/kg/min. As concentrações de creatinina urinária foram determinadas por método colorimétrico, utilizando o kit da Lab Test[®] (Lagoa Santa, MG) e as concentrações plasmáticas foram obtidas pela reação de *Jaffé* modificada, a fim de minimizar a interferência dos componentes séricos. Para tal,

3.3.3. amostras de soro foram adicionadas a um reagente contendo 10% tungstato de sódio, 1,84% ácido sulfúrico e água deionizada e posteriormente centrifugadas a 4000 g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e adicionado a uma mistura de 10% NaOH e 1% ácido pícrico. A reação de end-point foi finalizada com a leitura a 520 nm em espectrofotômetro.

3.3.4. *Fração de excreção de sódio*: a partir da mensuração do sódio urinário e sérico por meio do fotômetro de chama (Digimed® DM-62), foi calculada a fração de excreção de sódio. O cálculo realizado se baseia na seguinte fórmula: $\left[\frac{(\text{Sódio Ur} * \text{Cr Sr})}{(\text{Sódio Sr} * \text{Cr Ur})} \right] * 100$, sendo *Sódio Ur* o sódio urinário, *Cr Sr* a creatinina sérica, *Sódio Sr* o sódio sérico e *Cr Ur* a creatinina urinária. O resultado foi expresso em porcentagem.

3.3.5. *Concentração de albumina urinária*: foi determinada por ELISA, utilizando kit específico para avaliação da albumina urinária de ratos (Nephtrac, Exocell®). O experimento foi realizado a partir da diluição das amostras de urina em 10 vezes e seguindo as instruções do fabricante. Os resultados foram normalizados por creatinina.

3.4. Aferição indireta da PA

Para o acompanhamento da PA durante o estudo, foi realizado pletismografia caudal, um experimento não invasivo com aquisição de valores pressóricos em ratos acordados, utilizando um pletismógrafo, BP-2000 Série II (Visitech Systems®) (Figura 13 A). Nesse equipamento previamente calibrado, os ratos são acondicionados em contêntores de ferro sobre uma plataforma aquecida (38°C) e com ventilação adequada (Figura 13 B).

Para realizar o procedimento, a cauda dos animais é encaixada a um manguito de borracha ligado a um esfigmomanômetro, que infla e desinfla periodicamente. O

equipamento utiliza fotoplethysmografia de transmissão, em que a variação na quantidade de luz transmitida através da cauda é analisada para determinar a pressão arterial e a pulsação do rato. Assim, quando o sangue arterial chega à cauda os vasos se dilatam rapidamente, de forma que dispersam mais a luz vermelha, esse é o indicativo de uma sístole. À medida que a pressão de chegada desse sangue diminui, os vasos da cauda se contraem e dispersam menos luz, sendo este momento correspondente à diástole. A variação da luz transmitida através da cauda é exibida na tela do computador e convertida em valores numéricos (Figura 13 C).

Este procedimento fornece valores de PAS, PAD e FC, porém só utilizamos os valores de PAS, pois o sinal da diastólica é fraco e consideramos pouco fidedigno ao valor real. O protocolo estabelecido para aquisição dos valores de PA inclui três dias de adaptação dos ratos ao equipamento e dois dias de aferição. Nos dois dias de aferição, a média de uma sequência com no mínimo 10 medidas de PAS, com variação máxima entre elas de 15 mmHg, são anotadas e posteriormente calculadas (Figura 13 D). Ao final deste protocolo, o valor considerado de PA para cada rato foi a média entre os valores obtidos nos dias de aferição. O procedimento foi realizado antes do início do tratamento, a cada sete dias e na última semana do estudo.

Figura 13. Ilustração do pletismógrafo BP-2000 Série II (Visitech Systems®). Em A: temos a visualização geral do equipamento funcionando, B: a disposição dos ratos em contentores de ferro sobre a placa aquecida e ventilada, C: a aquisição dos valores de pressão sistólica e diastólica a partir da variação de luz transmitida através da cauda e D: protocolo estabelecido para o experimento.

3.5. Aferição direta da PA

Além da pletismografia de cauda, realizamos a aferição da pressão arterial diretamente pela artéria carótida. Esse procedimento foi invasivo e utilizamos o anestésico Pentobarbital (50mg/kg) via intraperitoneal (i.p.), aplicado com agulha de diâmetro externo de 0,6mm (102). O Pentobarbital atua deprimindo o sistema nervoso central e é metabolizado no fígado. Esse barbitúrico age nos receptores do ácido gama aminobutírico (GABA) prolongando o tempo de abertura dos canais para cloreto, potenciando o efeito do GABA. Sua ação periférica inclui diminuição da liberação de acetilcolina na membrana pós-sináptica. Em doses hipnóticas, o Pentobarbital afeta pouco

a função cardíaca e pressão arterial, desta forma, as diferenças entre os grupos de ambas as linhagens foram mantidas. Após a sedação do rato, a carótida foi exposta e isolada com o auxílio de pinças cirúrgicas e a cânula PE 10, previamente preenchida com solução fisiológica (0,9% NaCl) (Figura 14 A), foi inserida na artéria carótida. Esta cânula foi então acoplada a outra cânula (PE 50) também preenchida com solução salina e esta última conectada ao transdutor (ADInstrumentPowerLab[®] 4/35) (Figura 14 B), também preenchido com solução fisiológica. O tempo de medição para cada rato foi de 10 a 15 minutos, contados após a estabilização das aquisições pelo transdutor (Figura 14 C). Os parâmetros observados neste experimento foram: PAS, PAD e FC. Os dados adquiridos foram enviados ao software do computador (LabChart[®]), onde foram analisados (Figura 14 D).

Figura 14. Ilustração da aferição direta de PA por meio da canulação da artéria carótida. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os protocolos éticos

exigidos em pesquisa com animais. Os ratos anestesiados com Pentobarbital (50mg/kg i.p.) tiveram a artéria carótida canulada (A). A cânula foi acoplada ao transdutor (ADInstrumentPowerLab® 4/35) preenchido com solução fisiológica (B) e os dados foram enviados a um computador, onde podem ser analisados pelo programa LabChart® (D). Em C está ilustrado o experimento de aferição direta em ação.

3.6. Teste oral de tolerância à glicose (do inglês *Oral Glucose Tolerance Test – OGTT*)

Na segunda metade da última semana de tratamento os ratos foram colocados em jejum por dez horas. Após esse período, a glicose de jejum foi mensurada por meio do teste glicêmico com fitas do kit Accu Chek® modelo Performa. Em seguida, foi administrado nos ratos por via oral, gavagem com 2% glicose (2g/kg). Ainda utilizando o kit AccuCheck® a glicemia foi mensurada em 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos cronometrados a partir do momento de administração da glicose via oral. A partir dos valores glicêmicos adquiridos, a curva glicêmica foi calculada utilizando a área sob a curva dos valores de glicemia em função dos diferentes tempos.

3.7. Eutanásia e descarte do material biológico

Após o período de tratamento e os experimentos finais, os ratos foram anestesiados com pentobarbital (50mg/kg i.p.) (102), o sangue arterial foi coletado via artéria aorta abdominal, os rins foram removidos, e por fim, os animais foram eutanasiados por deslocamento da cervical. Os rins removidos foram descapsulados, pesados, processados em tampões específicos para análises posteriores e mantidos em freezer -80°C.

As carcaças dos ratos foram mantidas em câmara fria localizada no biotério do Instituto do Coração, Hospital das Clínicas, embaladas em sacos específicos para o descarte de material biológico. O recolhimento foi realizado pela prefeitura de São Paulo e conduzido até o local para sua incineração.

3.8. Preparação de homogenato de proteínas de córtex renal e determinação da concentração proteica

Após a retirada dos rins, a cápsula renal foi removida com o auxílio de pinça e tesoura cirúrgica. O rim direito foi cortado longitudinalmente e as porções referentes ao córtex e medula foram separadas. Os córtices e medulas renais foram transferidos para frascos contendo solução tampão de fosfato-salino (PBS) gelado pH 7,4, constituído por 150 mM NaCl; 2,8 mM fosfato monobásico; 7,2 mM fosfato de sódio dibásico. Nesta solução, foram adicionados os inibidores de protease (0,7 ug/mL pepstatina A, 0,5 ug/mL leupeptina e 40 ug/mL PMSF) e os inibidores de fosfatase (50 mM pirofosfato de sódio decahidratado e 15 mM fluoreto de sódio). Estes tecidos foram homogeneizados com homogeneizador de tecidos (POLYMIX® PX-SR50E, Kinematica Inc.). O homogenato foi então dividido em alíquotas para o freezer -80°C e alíquotas em tubos para ultracentrífuga. A fração correspondente à de proteínas totais de membrana de córtex renal foi isolada do homogenato por meio de centrifugações diferenciadas. A determinação da concentração de proteínas foi obtida pelo método de *Lowry* (103).

3.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS para proteína

A separação das proteínas foi realizada utilizando o gel de poliacrilamida-SDS, segundo *Laemmli* (104). Amostras de proteínas foram ressuspensas em 50 µL de tampão de amostra para eletroforese (pH 6,8; 62,5 mM tris-HCl; 10% SDS; 20% glicerol; 1,96% β-mercaptoetanol; 0,01% azul de bromofenol). Em seguida, o conteúdo foi aplicado no gel imerso em tampão de eletroforese (pH 8,8; 25 mM tris-base; 192 mM glicina), juntamente com um padrão de massa molecular (Precision Plus Protein™ Kaleidoscope Bio-Rad®). O gel de corrida foi preparado com concentração de acrilamida

7,5% e o gel de empilhamento foi preparado a 3%. Estes foram montados em equipamento próprio para eletroforese de proteína com espaçadores que permitiram que a espessura do gel fosse de 1,5 mm. A corrida foi interrompida de acordo com o tamanho de proteínas desejado, utilizando o marcador de peso molecular como referência.

3.10. Immunoblotting

Após a eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS, as proteínas do gel foram transferidas para membrana PVDF (*Immobilon-P Transfer Membrane, Millipore®*) previamente hidratada com 100% metanol e equilibrada em trampão de transferência (25 mM tris-base, 192 mM glicina, 20% metanol). Para a transferência, foi utilizado o sistema de sanduíche (GE *Healthcare®*, TE62), submerso, overnight e a 4°C. Após a transferência, a membrana foi corada com *Ponceau* (solução contendo 0,1% Ponceau Sigma e 10% ácido acético) para a visualização das bandas.

Em sequência, a membrana foi bloqueada em solução de blotto [solução contendo 5% de leite em pó desnatado; tampão (150 mM NaCl; 2,8 mM fosfato de sódio monobásico; 7,2 mM fosfato de sódio dibásico); 0,1% Tween 20; água milli Q q.s.p.] ou BSA [solução contendo 5% de albumina sérica bovina (BSA); tampão (pH 7,4; 50 mM tris-base; 150 mM NaCl); 0,1% Tween 20; água milli Q q.s.p.] para evitar possíveis ligações inespecíficas durante a incubação com o anticorpo primário. Posteriormente, esta foi incubada com os anticorpos primário, secundário (Tabela 3) e ECL (reagente para imuno-deteção através de quimioluminescência). A visualização das bandas foi realizada por meio de um fotodocumentador (GE *Healthcare®*, *ImageQuant LAS 4000*) e analisadas por densitometria (*Image J®*).

Os anticorpos primário e secundário utilizados neste estudo estão apresentados e detalhados na tabela a seguir:

Tabela 3. Lista de anticorpos utilizados no estudo.

Anticorpo primário	Fonte	Diluição (v/v)	Solução utilizada
NHE3 total	Doação Peter Aronson (<i>Yale, University</i>)	1:1000	Blotto
PS552	Santa Cruz <i>Bioechnology</i> [®]	1:1000	Blotto
Ser/Thr PKA	<i>Cell Signalling</i> [®]	1:1000	BSA
AGT	Santa Cruz <i>Biotechnology</i> [®]	1:1000	BSA
Actina	<i>Abcam</i> [®]	1:5000	Blotto
HRP-Anti-mouse IgG	<i>Jackson ImmunoResearch</i> [®]	1:2000	Blotto
HRP-Anti-goat	<i>Jackson ImmunoResearch</i> [®]	1:2000	BSA
HRP-Anti-rabbit	<i>Jackson ImmunoResearch</i> [®]	1:2000	BSA

3.11.ELISA para AGT urinário

Sabendo que a concentração urinária de AGT é utilizada como marcador da ativação do SRA intrarrenal (105,106), foram realizados ensaios de ELISA para avaliar a excreção urinária de AGT. O kit ELISA utilizado foi o da empresa IBL[®] com amostras de urina da gaiola metabólica ao final do tratamento. As amostras de urina foram diluídas em 50 vezes e o experimento foi conduzido de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados foram normalizados pelo valor de creatinina e foram representados em ng/mg.

3.12. Determinação da atividade da PKA em córtex renal

Quantidades equivalentes de amostra de proteínas de membrana de córtex renal foram submetidas à eletroforese em gel SDS-PAGE e *immunoblotting* utilizando o

anticorpo específico que reconhece resíduos de serina treonina fosforilados por PKA (107).

3.13. ELISA para insulina de jejum

Para avaliar a concentração sérica de insulina de jejum foi realizado o kit ELISA da marca Millipore®. As amostras de soro foram submetidas ao ensaio imunoenzimático seguindo as instruções do fabricante. Os resultados foram expressos em ng/mL.

3.14. Imunohistoquímica

O rim esquerdo de ratos *SHR* e *Wistar* foi cortado transversalmente em seções de 3 mm e fixado em paraformaldeído durante 24 horas. Após esse período, as seções dos rins foram colocadas em cassetes histológicos e armazenadas em 70% etanol. Após esse preparo prévio do tecido, as seções de rim foram embebidas em parafina e posteriormente fatiadas no micrótomo de 5 µm de espessura.

As lâminas com seções de rim foram colocadas em solução desparafinizadora composta por citrato de sódio pH 6.0 (*Dewaxing & Antigen Retrieval Buffer*, Spring) e em sequência foram lavadas com PBS e 3% H₂O₂ por 4 vezes durante 4 minutos e 2 vezes durante 2 minutos, com o propósito de bloquear a peroxidase endógena. As reações inespecíficas foram bloqueadas em 2% *goat serum* durante 20 minutos e então incubadas *overnight* com o anticorpo monoclonal de camundongo anti-ED1 (CD68) (diluição 1:100-v/v), para avaliar infiltração de macrófagos, ou α -actina de músculo liso (α -SMA) (diluição 1:100-v/v), para avaliar ativação intersticial de fibroblastos. Após as 18 horas de incubação, as seções de rim foram lavadas 3 vezes durante 5 minutos com PBS e incubadas com os respectivos anticorpos secundários conjugados com HRP (1:200-v/v). As imunorreações foram detectadas com o 3,3'-diaminobenzidina (DAB- Zymed®)

durante 2 minutos e por fim a lâmina foi montada com a lamínula e a resina de forma permanente.

As análises foram realizadas em microscópio de luz com aumento de 400x utilizando o software Quantimet Leica[®]. Para cada lâmina foram analisados 20 campos e o resultado foi expresso como média do número de células CD68 positivas por campo e média da área marcada para α -SMA por campo.

3.15. Análise estatística

Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média (EPM). O n experimental foi indicado em *scatter-dot plot* ou escrito na legenda dos gráficos temporais. As comparações entre os grupos experimentais foram realizadas por análise de variância de uma via (*one-way* ANOVA) e pós-teste de Bonferroni. Foi considerada significância estatística quando o p-valor foi menor ou igual a 0,05.

4. RESULTADOS

4.1. Efeitos do bloqueio em longo prazo do GLP-1R sobre os níveis pressóricos e função renal de ratos *SHR* e *Wistar*

Estudos mostrando os efeitos extraglicêmicos da administração de agonistas do GLP-1R em concentrações farmacológicas, incluindo o próprio GLP-1, demonstraram redução da pressão arterial em indivíduos hipertensos e modelos experimentais de hipertensão (76–79). Por sua vez, dado que o bloqueio agudo do GLP-1R aumenta a reabsorção renal de sódio e reduz o RFG (75), demonstrando que a ativação fisiológica deste receptor exerce efeitos sobre a homeostase volêmica, levantamos a hipótese de que o tratamento em longo prazo com o antagonista do GLP-1R poderia aumentar a PA.

Como mostrado na Figura 15 A, os três grupos de ratos SHR apresentavam níveis pressóricos semelhantes previamente ao início do tratamento. Em resposta ao tratamento com exendin-9, os ratos *SHR* demonstraram progressivo aumento de PA, ao passo que o tratamento com exenatide atenuou a elevação natural da PA nesta linhagem, quando comparados ao controle. Corroborando esses dados, a medida direta da PAS aferida de forma invasiva por meio da canulação da artéria carótida, apresentou o mesmo padrão de resultados que os dados de pletismografia caudal na última semana de tratamento. Como mostrado na Figura 15 C, o tratamento com exendin-9 aumentou a PAS (149 ± 1 vs. 139 ± 3 mmHg, $p < 0,01$), enquanto que o tratamento com exenatide reduziu esses valores (127 ± 1 vs. 139 ± 3 mmHg, $p < 0,01$) em comparação com o controle. Ademais, não foram encontradas diferenças significativas quanto à PAD e FC (Figura 15 D-E).

A Figura 15 B apresenta temporalmente os valores pressóricos em resposta aos tratamentos administrados nos ratos *Wistar*. Neste gráfico notamos que previamente ao início do tratamento, os três grupos apresentavam valores de PA semelhantes. Entretanto,

o tratamento com exendin-9 foi capaz de aumentar significativamente e progressivamente os níveis de PA a partir da segunda semana de tratamento. Por outro lado, o tratamento com exenatide não demonstrou diferença quando comparado ao controle desta linhagem. De forma similar ao resultado de pletismografia da última semana de tratamento, as aferições diretas da PA demonstraram aumento da PAS no tratamento com exendin-9 (116 ± 5 vs. 101 ± 1 mmHg, $p < 0,01$), ao passo que o tratamento com exenatide não mostrou diferença quando comparado ao controle (Figura 15 F). Ademais, não foram encontradas diferenças significativas na PAD e FC nesta linhagem (Figura 15 G-H).

Em conjunto esses dados apresentados confirmam que o bloqueio em longo prazo da ativação da sinalização endógena do GLP-1R eleva a pressão arterial em ratos hipertensos e normotensos.

Figura 15. O bloqueio em longo prazo do GLP-1R intensifica o aumento dos níveis pressóricos em ratos *SHR* e altera a pressão arterial em ratos *Wistar*. A e B: pressão arterial caudal foi aferida antes e semanalmente após o início do tratamento. Antes da eutanásia, os ratos *SHR* e *Wistar* foram submetidos à canulação da artéria carótida para mensuração direta dos valores de PAS (pressão arterial sistólica) (C e F), PAD (pressão arterial diastólica) (D e G) e FC (frequência cardíaca) (E e H). O número de ratos para a avaliação da pressão arterial caudal (A e B) variou de 4 a 8 por grupo. Os valores foram expressos como média $\pm$ o erro padrão da média (EPM) com o número de ratos utilizados em cada grupo representado no *scatter-dot plot* (C-H). * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$ vs. Ctrl e ††† $P < 0,001$ vs. Ex9.

A seguir estão tabulados os dados referentes aos parâmetros biométricos observados previamente e ao final das quatro semanas de tratamento e os dados de função renal.

Tabela 4. Efeitos do bloqueio em longo prazo do GLP-1R sobre peso corporal e função renal de ratos *SHR*

	<i>SHR-Ctrl</i>	<i>SHR-Ex9</i>	<i>SHR-Ex4</i>
Peso corpóreo inicial (g)	103 ± 1 (14)	103 ± 1 (20)	101 ± 2 (15)
Peso corpóreo final (g)	208 ± 5 (14)	213 ± 2 (20)	202 ± 5 (15)
Ganho de peso (%)	126 ± 8 (14)	140 ± 9 (20)	96 ± 6* (15)
Consumo de ração (mg/kg por dia)	100 ± 5 (8)	101 ± 4 (8)	104 ± 4 (9)
Consumo de água (mL/kg por dia)	72 ± 2 (8)	77 ± 3 (8)	79 ± 4 (9)
Fluxo urinário (mL/kg por dia)	40 ± 6 (8)	42 ± 5 (8)	44 ± 7 (9)
RFG (mL/kg por min)	7,7 ± 0,5 (8)	7,1 ± 0,5 (8)	7,7 ± 0,7 (9)
FE Na⁺ (%)	0,68 ± 0,08 (8)	0,74 ± 0,07 (8)	0,75 ± 0,04 (9)
Albumina urinária (Razão albumina/creatinina)	0,27 ± 0,03 (6)	0,46 ± 0,04** (7)	0,18 ± 0,01 ††† (7)

Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) com o número de ratos de cada grupo entre parênteses. *P<0,05 **P<0,01 vs. Ctrl e ††† P<0,001 vs. Ex9, calculado pelo ANOVA one-way seguido por pós-teste de Bonferroni's. Ratos *SHR* foram tratados com salina (Ctrl), antagonista do GLP-1R, exendin-9, ou agonista do GLP-1R, exendin-4, durante 28 dias. Os resultados de consumo de ração e água foram normalizados pelo peso corpóreo. O fluxo urinário foi mensurado por gravimetria. O clearance de creatinina foi usado para estimar o ritmo de filtração glomerular (RFG). A fração de excreção (FE) de Na⁺ foi expressa em porcentagem e calculada como C_i/C_{Cr} em que C_i é o clearance do íon e C_{Cr} é o clearance de creatinina. A albumina urinária foi determinada por ELISA e normalizada pela creatinina urinária.

Tabela 5. Efeitos do bloqueio em longo prazo do GLP-1R sobre peso corporal e função renal de ratos *Wistar*

	<i>Wistar-Ctrl</i>	<i>Wistar-Ex9</i>	<i>Wistar-Ex4</i>
Peso corpóreo inicial (g)	165 ± 7 (8)	154 ± 4 (8)	157 ± 5 (8)
Peso corpóreo final (g)	291 ± 6 (7)	270 ± 7 (8)	245 ± 5*** † (8)

Ganho de peso (%)	71 ± 5 (7)	69 ± 2 (8)	50 ± 2 *** †† (8)
Consumo de ração (mg/kg por dia)	77 ± 4 (8)	79 ± 2 (8)	70 ± 8 (8)
Consumo de água (mL/kg por dia)	131 ± 9 (8)	109 ± 2 (8)	162 ± 16 †† (8)
Fluxo urinário (mL/kg por dia)	68 ± 6 (8)	50 ± 4 (8)	94 ± 21 (8)
RFG (mL/kg por min)	7,6 ± 0,5 (5)	6,8 ± 0,4 (8)	7,5 ± 0,5 (5)
FE Na⁺ (%)	0,71 ± 0,13 (4)	0,62 ± 0,06 (8)	0,71 ± 0,18 (6)
Albumina urinária (Razão albumina/creatinina)	0,04 ± 0,01 (8)	0,14 ± 0,02** †† (8)	0,04 ± 0,01 (8)

Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) com o número de ratos de cada grupo entre parênteses. **P<0,01 ***P<0,001 vs. Ctrl e † P<0,05 †† P<0,01 vs. Ex9, calculado pelo ANOVA one-way seguido por pós-teste de Bonferroni's. Ratos *Wistar* foram tratados com salina (Ctrl), antagonista do GLP-1R exendin-9 ou agonista do GLP-1R, exendin-4, durante 28 dias. Os resultados de consumo de ração e água foram normalizados pelo peso corpóreo. O fluxo urinário foi mensurado por gravimetria. O clearance de creatinina foi usado para estimar o ritmo de filtração glomerular (RFG). A fração de excreção (FE) de Na⁺ foi expressa em porcentagem e calculada como C_i/C_{Cr} em que C_i é o clarence do íon e C_{Cr} é o clearance de creatinina. A albumina urinária foi determinada por ELISA e normalizada pela creatinina urinária.

Como resumido nas Tabelas 4 e 5, o bloqueio em longo prazo do GLP-1R pelo exendin-9 não alterou o ganho de peso corporal, ao passo que o exenatide reduziu esse ganho em comparação com o tratamento com solução salina em ratos *SHR* (96 ± 6 vs. 126 ± 8% p<0,05) e *Wistar* (50 ± 2 vs. 71 ± 5%, p<0,001). Nenhuma diferença estatística foi constatada a respeito da ingestão de água ou ração entre os grupos em comparação com o grupo controle em ambas as linhagens. Além disso, o tratamento de quatro semanas não alterou o fluxo urinário ou a fração de excreção de sódio. Houve tendência à redução do RFG em ratos *SHR* e *Wistar* tratados com exendin-9, entretanto, essa diferença não alcançou significância estatística (valor de p = 0,09).

4.2. Efeitos do bloqueio em longo prazo da via de sinalização endógena do GLP-1/GLP-1R em córtex renal de ratos *SHR* e *Wistar*

Para confirmar a inibição da ativação do complexo GLP-1/GLP-1R e a deflagração da via da PKA em córtex renal, avaliamos os níveis de fosforilação dos resíduos de serina e treonina fosforilados pela PKA (Figura 16) por immunoblotting. Este experimento nos permite inferir, indiretamente, maior ou menor atividade da via da PKA por meio de níveis mais altos ou mais baixos da expressão desses resíduos, respectivamente.

Figura 16. O bloqueio em longo prazo do GLP-1R reduz a atividade da PKA em córtex renal de ratos *SHR*. Quantidades equivalentes de amostras de proteínas de membrana de córtex renal (25µg de proteína para pSer/Thr e 15µg para actina) foram

submetidas a SDS-PAGE, transferidas para membrana PVDF e avaliadas por immunoblotting. A e C: as membranas foram incubadas com o anticorpo contra resíduos de serina e treonina fosforilados por PKA (1:1000-v/v) e actina (1:5000-v/v). B e D: representação gráfica da quantificação de bandas obtidas em A e C, representando indiretamente a atividade da PKA em ratos *SHR* e *Wistar*, respectivamente. O resultado final é obtido pela soma de todas as densitometrias de banda marcados por fileira e normalizados pela actina. Os valores foram expressos como média $\pm$ o erro padrão da média (EPM) com o número de ratos utilizados em cada grupo representado no *scatter-dot plot*. * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$ vs. Ctrl e †† $P < 0,01$ ††† $P < 0,001$ vs. Ex9.

Como mostrado na Figura 16 A e B, o tratamento de ratos *SHR* com exendin-9 reduziu os níveis de fosforilação desses resíduos (66 ± 9 vs. 100 ± 6 % *SHR*-Ctrl, $p < 0,01$), sugerindo menor ativação da via da PKA, enquanto que o exenatide demonstrou maiores níveis de fosforilação de tais resíduos (129 ± 5 vs. 100 ± 6 % *SHR*-Ctrl, $p < 0,05$) quando ambos são comparados ao controle desta linhagem, tratado com solução salina. Em ratos *Wistar* (Figura 16 C-D), o tratamento com exendin-9 não demonstrou diferenças significativas nos níveis de fosforilação dos resíduos, no entanto, o tratamento com exenatide aumentou substancialmente os níveis de fosforilação dos resíduos (126 ± 8 vs. 100 ± 2 % *Wistar*-Ctrl, $p < 0,05$) em comparação com o grupo controle desta linhagem, tratado com solução salina.

Em resumo, esses dados nos permitem concluir que há uma ação direta do tratamento em córtex renal, evidenciado pelo aumento na atividade da via da PKA no agonismo (exenatide) em ratos *SHR* e *Wistar*, e redução da atividade desta via no antagonismo (exendin-9) em ratos *SHR*.

4.3. Efeitos do bloqueio em longo prazo do GLP-1R sobre a fosforilação do NHE3 em túbulo proximal de ratos *SHR* e *Wistar*

O NHE3 é o principal responsável pela reabsorção de sódio na membrana apical do túbulo proximal (91,93). Dados anteriores do nosso grupo sugerem que o efeito

natriurético do GLP-1 é mediado, em parte, pela diminuição da atividade do NHE3 no túbulo proximal renal (108). Por sua vez, a redução da atividade deste trocador está relacionada a níveis mais altos de fosforilação do resíduo de serina 552, sítio consenso para a PKA, localizado na cauda citoplasmática do NHE3. Assim, nós levantamos a hipótese de que o tratamento em longo prazo com o exendin-9 poderia estimular o NHE3 e contribuir para uma possível retenção de sódio. Para tal, avaliamos a expressão do NHE3 total e os níveis de fosforilação do resíduo serina 552 em córtex renal de ratos *SHR* e *Wistar* por *immunoblotting* (Figura 17).

Figura 17. O bloqueio em longo prazo do GLP-1R reduz a razão relativa de fosforilação do NHE3 na serina 552 em túbulo proximal de ratos *SHR* e *Wistar*. Quantidades equivalentes de amostras de proteína de membrana de córtex renal (15µg de

proteína para NHE3, 5µg para PS552-NHE3 e 15µg para actina) foram submetidas à SDS-PAGE, transferidas para membrana PVDF e avaliadas por immunoblotting. A e C: as membranas foram incubadas com o anticorpo contra o NHE3 total (1:1000-v/v), NHE3 fosforilado na serina 552 (1:1000-v/v) e actina (1:5000-v/v). B e D: representação gráfica da razão relativa dos níveis de fosforilação da serina 552 e do NHE3 total em ratos *SHR* e *Wistar*, respectivamente. Os resultados foram mensurados por densitometria e normalizados pela actina. Os valores foram expressos como média $\pm$ o erro padrão da média (EPM) com o número de ratos utilizados em cada grupo representado no *scatter-dot plot*. *P<0,05 **P<0,01 vs. Ctrl e †P<0,05 †††P<0,001 vs. Ex9.

Em ambas as linhagens, a abundância total da proteína NHE3 não variou entre os grupos. Entretanto, os resultados quanto à fosforilação do NHE3 demonstraram que, em ratos *SHR* (Figura 17 A e B), o tratamento com exendin-9 reduziu os níveis de fosforilação do NHE3 na serina 552 (60 ± 5 vs. 100 ± 5 %*SHR*-Ctrl, p<0,01), ao passo que o exenatide aumentou tais níveis (114 ± 7 vs. 100 ± 5 %*SHR*-Ctrl, p<0,05) comparado ao grupo controle tratado com salina. De forma semelhante, os ratos *Wistar* (Figura 17 C e D) apresentaram menores níveis de fosforilação do NHE3 no tratamento com exendin-9 (81 ± 5 vs. 100 ± 4 % *SHR*-Ctrl, p<0,05) em comparação ao grupo controle, tratado com salina. Contudo, o tratamento com exenatide não demonstrou diferença significativa quando comparado ao *Wistar* controle. Em ambas as linhagens, a abundância total da proteína NHE3 não variou entre os grupos.

Em conjunto, estes dados demonstram que o bloqueio em longo prazo do GLP-1R reduz os níveis de fosforilação do resíduo 552 em ratos hipertensos e normotensos, sugerindo indiretamente maior atividade do NHE3. Este efeito pode contribuir em parte para o aumento dos níveis pressóricos em ratos *SHR* e elevação da pressão arterial em ratos *Wistar*, via aumento da reabsorção de sódio no túbulo proximal renal.

4.4. Efeitos do bloqueio em longo prazo do GLP-1R sobre o dano renal em ratos

SHR e Wistar

Investigamos também se o bloqueio em longo prazo do GLP-1R poderia potencializar a progressão do dano renal naturalmente desenvolvido em *SHR*, enquanto que o agonismo atenuaria este dano via efeitos renoprotetores previamente descritos em resposta ao exenatide.

Como visto na Tabela 4 (*SHR*) e 5 (*Wistar*), após quatro semanas de tratamento com o exendin-9, a razão albumina/creatinina dos ratos *SHR* e *Wistar* aumentou significativamente em comparação com o controle do *SHR* ($0,46 \pm 0,04$ vs. $0,27 \pm 0,03$, $p < 0,01$) e *Wistar* ($0,14 \pm 0,02$ vs. $0,04 \pm 0,01$, $p < 0,01$), tratado com solução salina. Ademais, o tratamento com exenatide não alterou a excreção urinária de albumina nos ratos *SHR* e *Wistar* quando comparados aos seus respectivos controles.

Diante disto, investigamos possíveis mudanças estruturais no rim. Para tal realizamos imunohistoquímica para marcação de α -SMA e CD68.

Figura 18. O bloqueio em longo prazo do GLP-1R intensifica o dano renal em ratos *SHR*. Micrografias representativas (400x ampliação) de seções do rim esquerdo marcadas com α -actina de músculo liso (α -SMA) (A e E), para identificar ativação intersticial de miofibroblastos, ou CD68⁺ (C e G), para identificar infiltração por macrófagos em ratos *SHR* e *Wistar*. B e F: quantificação da marcação para α -SMA em córtex renal foi expresso como porcentagem da área total. D e H: quantificação da marcação para CD68 foi expresso como número de células positivas para CD68 por campo. Foram analisadas 20 imagens digitalizadas a 400x de ampliação por lâmina. Os valores foram expressos como média $\pm$ o erro padrão da média (EPM) com o número de ratos utilizados em cada grupo representado no *scatter-dot plot*. ND: Não detectável. * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$ vs. Ctrl e ††† $P < 0,001$ vs. Ex9.

A Figura 18 A e B mostra que o marcador de ativação de miofibroblastos, α -SMA, apresentou maior porcentagem de área marcada em *SHR* tratados com exendin-9 do que naqueles que receberam salina ($1,24 \pm 0,23$ vs. $0,72 \pm 0,04$ de área, $p < 0,05$). Além disso,

o número de células positivas por campo marcado para CD68 (Figura C e D), indicando infiltração por macrófagos em córtex renal, foi maior no tratamento com exendin-9 do que no controle (29 ± 2 vs. 18 ± 2 CD68⁺/campo, $p < 0,001$). Ademais, o tratamento com exenatide reduziu a área percentual de α -SMA ($0,27 \pm 0,11$ vs. $0,72 \pm 0,04$ de área, $p < 0,05$) (Figura A e B) e reduziu a infiltração por macrófagos no córtex renal (12 ± 2 vs. 18 ± 2 células CD68⁺/campo, $p < 0,001$) (Figura C e D) quando comparado com ratos *SHR* tratados com solução salina. Por sua vez, em ratos *Wistar*, a marcação para α -SMA ou CD68⁺ não pode ser detectada (Figura 18 E-H).

Em conjunto, estes resultados indicam que o bloqueio em longo prazo do GLP-1R exacerba a lesão renal em ratos *SHR* evidenciada por albuminúria, fibrose renal e inflamação mais elevadas. Já o tratamento com exenatide foi capaz de prevenir essa exacerbação do dano renal possivelmente mediado pelo aumento da ativação da sinalização do GLP-1R promovendo renoproteção ou devido ao controle dos níveis pressóricos neste grupo de ratos. Embora os ratos *Wistar* tratados com exendin-9 tenham apresentado maior excreção urinária de albumina que os ratos tratados com salina, esse resultado funcional não foi acompanhado por mudanças estruturais no rim dessa linhagem.

4.5. Efeitos do bloqueio em longo prazo do GLP-1R sobre a homeostase glicêmica em ratos *SHR* e *Wistar*

Estudos recentes demonstraram que a perturbação da homeostase glicêmica está intrincada com complicações clínicas graves, contribuintes para doenças cardiorrenais. Assim, investigamos se o bloqueio em longo prazo do GLP-1R poderia comprometer a homeostase glicêmica em ratos *SHR* e *Wistar* e quais os efeitos subjacentes.

Como demonstrado na Figura 19 A e C, os ratos *SHR* tratados com exendin-9 demonstraram maior área sob a curva (AUC) (19.305 ± 509 vs. 16.832 ± 197 AUC, $p < 0,05$) em função do tempo após a administração de glicose a 2%, enquanto que o tratamento com exenatide reduziu a AUC (14.702 ± 927 vs. 16.832 ± 509 AUC, $p < 0,05$) quando comparados ao grupo controle. Por outro lado, os ratos *Wistar* não demonstraram diferenças significativas entre os grupos tratados com exendin-9 e salina, porém o tratamento com exenatide reduziu os valores de AUC principalmente após 15 minutos de gavagem de glicose a 2% (15.281 ± 629 vs. 17.706 ± 566 AUC, $p < 0,05$) (Figura 19 B e F). Ademais, a administração de exendin-9 ou exenatide não alterou os níveis séricos de glicose em jejum de ratos *SHR* (Figura 19 D), mas reduziu os valores de glicose em jejum dos ratos *Wistar* tratados com exenatide (Figura 19 G). A análise da concentração sérica de insulina em jejum dos ratos *SHR* (Figura 19 E) ($1,03 \pm 0,06$ vs. $0,79 \pm 0,02$ ng/mL, $p < 0,01$) e *Wistar* (Figura 19 H) ($0,83 \pm 0,1$ vs. $0,53 \pm 0,04$ ng/mL, $p < 0,01$) tratados com exendin-9 foram maiores quando comparados ao controle. Já o tratamento com exenatide, reduziu a concentração sérica de insulina de ratos *SHR* ($0,56 \pm 0,05$ vs. $0,79 \pm 0,02$ ng/mL, $p < 0,01$) para níveis próximos ao de *Wistar* tratado com solução salina.

Em conjunto, esses dados demonstram que o tratamento com exendin-9 alterou a homeostase glicêmica de ratos hipertensos e normotensos, sugerindo piora da sensibilidade à insulina nos ratos *SHR* e desenvolvimento de resistência à insulina em ambas as linhagens.

Figura 19. O bloqueio em longo prazo do GLP-1R altera a homeostase glicêmica e aumenta a insulina sérica de jejum em ratos *SHR* e *Wistar*. Na última semana do tratamento os ratos foram deixados em jejum por dez horas e a glicemia foi medida utilizando fitas do kit glicêmico Accu-Check® Perfoma (D e G). Em seguida, os ratos receberam glicose 2% por gavagem e a glicemia foi medida em diferentes tempos, sendo 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a gavagem. A partir dos dados de glicemia foi traçado o gráfico da curva glicêmica em função do tempo (A e B) e calculado a área sobre a curva (AUC) de cada grupo (C e F). O sangue arterial coletado em jejum ao final do tratamento foi utilizado para mensurar a concentração sérica de insulina de jejum utilizando ELISA (E e H). O número de ratos para o teste oral de tolerância à glicose (A e B) variou de 4 a 8 por grupo. Os valores foram expressos como média $\pm$ o erro padrão da média (EPM) com o número de ratos utilizados em cada grupo representado no *scatter-dot plot*. * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$ vs. Ctrl e † $P < 0,05$ †† $P < 0,01$ ††† $P < 0,001$ vs. Ex9.

4.6. Efeitos do bloqueio em longo prazo do GLP-1R sobre o SRA intrarrenal

Como alterações nos níveis pressóricos e ativação do NHE3 por meio da redução dos níveis de fosforilação da serina 552 são fenômenos intimamente associados com as ações da angiotensina II (109), levantamos a hipótese de que o SRA intrarrenal pudesse estar mais ativado em resposta ao tratamento com exendin-9. Para tal, realizamos testes ELISA para AGT urinário e *immunoblotting* para AGT sérico, haja vista que a excreção urinária de AGT é reconhecida como marcador de atividade do SRA intrarrenal (105,106)

Figura 20. O bloqueio em longo prazo do GLP-1R aumenta a excreção urinária de AGT em ratos *SHR* e *Wistar*. A e D: A expressão do AGT circulante foi determinada por imunoblotting. Quantidades equivalentes de volume de soro (0,5µL) de cada animal foi submetida à SDS-PAGE, transferida para membrana PVDF e avaliada por imunoblotting. As membranas foram coradas com Ponceau e então incubadas com o anticorpo contra AGT (1:1000-v/v). B e E: representação gráfica da quantificação da expressão proteica de AGT no soro de ratos *SHR* e *Wistar*, respectivamente. Os resultados foram estimados por densitometria e normalizados por albumina. C e F: Foram realizadas gaiolas metabólicas de 24 horas ao final do tratamento e a urina coletada foi utilizada para avaliar a excreção urinária de AGT por meio de ELISA. Os valores foram expressos como

média $\pm$ o erro padrão da média (EPM) com o número de ratos utilizados em cada grupo representado no *scatter-dot plot*. * $P < 0,05$ *** $P < 0,001$ vs. Ctrl e †† $P < 0,01$ ††† $P < 0,001$ vs. Ex9.

Como mostrado na Figura 20, não foram observadas diferenças na abundância de AGT no soro entre os grupos de ratos *SHR* (Figura 20 A e B) e *Wistar* (Figura 20 D e E). No entanto, encontramos aumento da excreção urinária de AGT no grupo de *SHR* (102 ± 9 vs. 47 ± 7 ng/mg, $p < 0,001$) e *Wistar* (16 ± 3 vs. 4 ± 1 ng/mg, $p < 0,001$) tratados com exendin-9, enquanto que o tratamento com exenatide reduziu essa excreção urinária apenas em *SHR* (20 ± 3 vs. 47 ± 7 ng/mg, $p < 0,05$) em comparação aos respectivos controles (Figura 20 C e F). Em suma, esses dados sugerem que o bloqueio em longo prazo do GLP-1R pelo exendin-9 é capaz de promover o aumento da excreção urinária de AGT em ambas as linhagens, o que é um indicativo de ativação do SRA intrarrenal.

5. DISCUSSÃO

Os efeitos anti-hipertensivos dos agonistas do GLP-1R têm sido extensivamente estudados em modelos experimentais (76,77) e ensaios clínicos (78,79) e estão associados a propriedades natriuréticas, diuréticas e vasodilatadoras resultantes da ativação da sinalização do GLP-1R. No entanto, nenhum destes trabalhos demonstrou até o momento se a sinalização basal do GLP-1R é capaz de influenciar a regulação dos níveis pressóricos. Desta forma, nosso estudo fornece novas evidências de que a ativação da sinalização endógena do GLP-1R atenua o aumento da PA em ratos hipertensos e mantém os níveis pressóricos de ratos normotensos dentro de uma faixa normal.

O aumento dos níveis pressóricos promovido pelo antagonismo do GLP-1R em ambas as linhagens de ratos, demonstrou que o GLP-1 endógeno, primariamente envolvido com a homeostase glicêmica, regula também a PA. Os achados funcionais nos quais o GLP-1 se destaca como mediador da homeostase glicêmica e volêmica foram demonstrados por estudos conduzidos pelo nosso grupo em modelo animal (75). Adicionalmente, foi observado que a área sob a curva da concentração plasmática do GLP-1 durante um OGTT (pós prandial), correlaciona-se negativamente com a elevação da PAS em humanos saudáveis (80). Este achado fortificou nossa hipótese de que a sinalização endógena do GLP-1 exerce efeitos sobre regulação de PA. Cabe mencionar que o nocaute global para o GLP-1R não apresenta aumento na PAS ou PAD (110). A principal explicação para essa divergência de resultados é possivelmente uma resposta adaptativa desse modelo à ausência do receptor, que supre o papel do GLP-1 endógeno na regulação de sal e volume e consequentemente PA.

Nosso grupo demonstrou recentemente, que o GLP-1 apresenta um importante papel endógeno no manuseio do sódio no organismo, em parte via inibição do NHE3 no

TP (68,75). Esse achado elucidou um dos possíveis mecanismos pelos quais as terapias utilizadas no tratamento de pacientes com DM2, como os agonistas do GLP-1R e os inibidores da DPP-IV e do cotransportador sódio/glicose 2 (SGLT2), desempenham papel anti-hipertensivo, encontrando-se vinculados à natriurese e redução da atividade do NHE3. Em conjunto, os achados deste estudo estreitaram a relação entre a homeostase glicêmica e volêmica e sugerem que o NHE3 possa ser um elo a esse respeito.

No TP, a reabsorção de sódio mediada pelo NHE3 desempenha papel crucial na resposta de natriurese pressórica, responsável por manter a homeostase dos fluidos e conter os eventuais aumentos na PA (111–113). Em nosso estudo, demonstramos que o aumento da PA observado na linhagem hipertensa e normotensa foi acompanhada por menores níveis de fosforilação da serina 552 do NHE3, sugerindo indiretamente maior atividade deste trocador. Desta forma, acreditamos que o bloqueio em longo prazo da sinalização endógena do GLP-1R eleva a PA, pelo menos em parte, em decorrência da atenuação da resposta compensatória de natriurese pressórica no TP. Nos rins, o GLP-1R é encontrado apenas no TP e glomérulo (68,74,98,114,115). No entanto, não excluimos a possibilidade de que alterações na sinalização renal do GLP-1R também possam exercer efeitos indiretos sobre outros transportadores de sódio ao longo do néfron de ratos normotensos e hipertensos, devido às mudanças na carga de sódio que chega ao néfron distal, ou às ações que o GLP-1 demonstrou exercer em oposição às da Ang II (116,117). Além disso, é possível que existam outros mecanismos atuando nesse cenário de aumento da PA em ambas as linhagens de ratos.

Nosso estudo demonstrou que o bloqueio em longo prazo do GLP-1R aumentou a excreção urinária de AGT, reconhecido como um marcador de ativação intrarrenal do SRA (105,106), em ambas as linhagens. Em vista disto, é possível que a ativação do SRA

intrarrenal e consequente aumento nas concentrações de Ang II no tecido renal contribuem para o efeito estimulatório do NHE3, através da redução da fosforilação do NHE3 na serina 552, um sítio de consenso para a PKA. Recentemente, nosso grupo demonstrou que a Ang II contrapõe-se aos efeitos da fosforilação e da inibição do NHE3 induzidos pela AMPc/PKA pela ativação da sinalização do AT₁R/proteína Gi em células tubulares proximais renais (109). Sendo assim, é possível que os níveis de fosforilação do NHE3 possam mediar, parcialmente, as alterações no mecanismo compensatório de natriurese pressórica no tratamento com exendin-9 levando ao aumento da atividade deste trocador. Curiosamente, o tratamento com o agonista do GLP-1R, exenatide, proporcionou redução significativa em até três vezes na excreção urinária de AGT em relação ao controle da linhagem hipertensa. Sugerindo, em parte, uma contraposição dos efeitos da ativação do GLP-1R ao aumento da atividade intrarrenal do SRA.

Estudos recentes mostraram que os agonistas do GLP-1R podem reduzir os níveis circulantes dos componentes do SRA, bem como as ações mediadas por este sistema (118–121). Esses estudos sugerem, em parte, que o GLP-1 ou os agonistas do GLP-1R podem apresentar ações que se contrapõem aos efeitos resultantes da ativação do SRA. Ademais, foi constatado tanto em modelos experimentais como em ensaios clínicos, que o GLP-1 aparentemente exibe ações que neutralizam os efeitos da Ang II (116,120,121). Mais especificamente, foi demonstrado que a ativação do GLP-1R inibe a sinalização intracelular do AT₁R, sendo este vinculado aos efeitos deletérios decorrentes da superestimulação do SRA, como inflamação e hipertensão (119,122). Em um estudo *in vitro* realizado em células mesangiais, demonstrou-se que o tratamento das culturas com o GLP-1 foi capaz de bloquear completamente as ações inflamatórias e oxidativas mediadas pela Ang II, de forma dependente da ativação da PKA (116), promovendo

renoproteção. Esses achados dialogam com nosso estudo, em que o tratamento com exendin-9 conduziu ao aumento de albuminúria em ambas as linhagens e infiltração de macrófagos e fibrose intersticial em ratos hipertensos. Isto demonstra que a inibição da sinalização de GLP-1R, *per se*, pode promover albuminúria, mas não inflamação e fibrose intersticial.

Além das ações da Ang II sobre a sinalização AMPc/PKA e fosforilação da serina 552, possivelmente contribuindo para o prejuízo do mecanismo compensatório de natriurese pressórica, o NHE3 também pode ter sua atividade regulada por hormônios associados ao metabolismo da glicose, incluindo a insulina (123) e a própria glicose (124). Assim, é possível que alterações na homeostase glicêmica que levem ao desenvolvimento de resistência à insulina possam contribuir para retenção de sódio e perturbação volêmica via aumento da ativação da sinalização natural da insulina. Em nosso estudo, constatamos aumento da insulina sérica em jejum e redução da área sob a curva de glicose, após um teste oral de tolerância à glicose, no bloqueio em longo prazo do GLP-1R. Esses dados sugerem uma piora na sensibilidade à insulina nos *SHR* e hiperinsulinemia em ambas as linhagens. Assim, é plausível que a hiperinsulinemia e a resistência à insulina desenvolvida nestes ratos possam contribuir para o aumento da pressão arterial por meio do aumento da reabsorção de sódio mediado pela estimulação da atividade do NHE3 pela insulina.

Em modelos experimentais e pacientes com DM2, o NHE3 encontra-se mais ativo, contribuindo fortemente para a hiperfiltração glomerular, retenção de sódio e albuminúria (125). Adicionalmente, relatou-se correlação entre o desenvolvimento de resistência à insulina e o declínio da função renal (126), bem como o aumento da albuminúria (127,128). Vale mencionar que a importância da condição de resistência

insulínica já é reconhecida na clínica como fator de risco para doenças cardiovasculares e renais, independentemente da aparente presença do DM2 (129). Estudos prévios sugerem que a hiperinsulinemia possa induzir a expansão volêmica e contribuir fortemente para o desenvolvimento da hipertensão, principalmente por estimular o transporte no túbulo proximal (130,131) através do NHE3 na superfície apical da célula e pelo co-transportador de sódio/bicarbonato (NBCe1) na superfície basolateral, via ativação de AKT (129,132,133). Além disso, estudos demonstraram *in vitro*, em modelo de células tubulares proximais, que a kinase 1 regulada por soro e glicocorticoides (SGK1) também promove efeito estimulatório sobre o NHE3 (123), mas não apenas via Ang II, como demonstrado anteriormente (134–136). Entretanto, neste trabalho, não foram identificadas diferenças nos níveis de fosforilação do NHE3. Ademais, Saad e colaboradores demonstraram aumento na expressão do NHE3 em células do túbulo proximal humano durante o tratamento com agonistas do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR γ) através da ativação de SGK1 (135). Embora a ação da insulina sobre a atividade do NHE3 tenha sido constatada por diversos estudos, ainda não se conhece os mecanismos pelos quais essa modulação ocorre. Em conjunto, os achados mencionados e a literatura sugerem que o NHE3 possui uma regulação complexa de sua atividade, incluindo mecanismos transcricionais e pós-traducionais.

Em suma, nossos dados (Figura 21) demonstraram que a ativação da sinalização endógena do GLP-1R apresenta importante papel na diminuição da reabsorção proximal de sódio via aumento dos níveis de fosforilação da serina 552 do NHE3, indicando indiretamente menor atividade deste trocador. Desta forma concluímos que esta sinalização do GLP-1R exerce ação natriurética que contribui para a regulação do balanço

de sódio, impede a expansão do volume e mantém a pressão arterial em níveis considerados normais.

Figura 21. Compilação dos resultados constatados no estudo. O esquema apresenta os achados constatados neste estudo a partir do bloqueio em longo prazo do GLP-1R com o antagonista, exendin-9, e estimulação do GLP-1R por meio do tratamento com exenatide em ratos hipertensos (*SHR*) e normotensos (*Wistar*). Isoforma 3 do trocador de sódio e hidrogênio (NHE3); sódio (Na^+); hidrogênio (H^+); proteína cinase A (PKA); adenilil cicase (AC); receptor de GLP-1 (GLP-1R); fosforilação (P); microvilosidades (MMV); sistema renina angiotensina (SRA); excreção urinária de angiotensinogênio (Ex Ur AGT).

6. CONCLUSÃO

A sinalização endógena do GLP-1R regula a pressão arterial sistólica. Esse efeito parece ser decorrente, ao menos em parte, das ações diretas e/ou indiretas do GLP-1 sobre a reabsorção de sódio em túbulo proximal mediada pelo NHE3.

Figura 22. Modulação do NHE3 em resposta ao bloqueio em longo prazo do GLP-1R pode envolver ativação do SRA intrarrenal e hiperinsulinemia promovendo aumento de PA. O esquema representa o possível mecanismo pelo qual o NHE3 encontra-se menos fosforilado e mais ativo no grupo submetido ao bloqueio em longo prazo do GLP-1R. Note que entre as hipóteses a respeito da redução da fosforilação e aumento da atividade do NHE3 envolve ativação do SRA intrarrenal inferido por maior excreção urinária de AGT, e aumento da concentração de insulina sérica em jejum. Isoforma 3 do trocador de sódio e hidrogênio (NHE3); sódio (Na⁺); hidrogênio (H⁺); fosforilação (P); proteína cinase A (PKA); adenilil cicase (AC); receptor de GLP-1 (GLP-1R); sistema renina angiotensina (SRA).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tolhurst G, Reimann F, Gribble FM. Nutritional regulation of glucagon-like peptide-1 secretion. **J Physiol.** 2009 Jan 1;587(1):27–32.
2. Mojsov S, Heinrich G, Wilson IB, Ravazzola M, Orci L, Habener JF. Preproglucagon gene expression in pancreas and intestine diversifies at the level of post-translational processing. **J Biol Chem.** 1986 Sep 5;261(25):11880–9.
3. Tucker JD, Dhanvantari S, Brubaker PL. Proglucagon processing in islet and intestinal cell lines. **Regul Pept.** 1996 Apr 9;62(1):29–35.
4. Sandoval DA, D'Alessio DA. Physiology of Proglucagon Peptides: Role of Glucagon and GLP-1 in Health and Disease. **Physiol Rev.** 2015 Apr;95(2):513–48.
5. Deacon CF. What do we know about the secretion and degradation of incretin hormones? **Regul Pept.** 2005 Jun 15;128(2):117–24.
6. Herrmann C, Göke R, Richter G, Fehmann H-C, Arnold R, Göke B. Glucagon-Like Peptide-1 and Glucose-Dependent Insulin-Releasing Polypeptide Plasma Levels in Response to Nutrients. **Digestion.** 1995;56(2):117–26.
7. Elliott RM, Morgan LM, Tredger JA, Deacon S, Wright J, Marks V. Glucagon-like peptide-1 (7-36) amide and glucose-dependent insulinotropic polypeptide secretion in response to nutrient ingestion in man: acute post-prandial and 24-h secretion patterns. **J Endocrinol.** 1993 Jul;138(1):159–66.
8. Wei Y, Mojsov S. Tissue-specific expression of the human receptor for glucagon-like peptide-I: brain, heart and pancreatic forms have the same deduced amino acid sequences. **FEBS Lett.** 1995 Jan 30;358(3):219–24.
9. Wheeler MB, Lu M, Dillon JS, Leng XH, Chen C, Boyd AE. Functional expression of the rat glucagon-like peptide-I receptor, evidence for coupling to both adenylyl cyclase and phospholipase-C. **Endocrinology.** 1993 Jul;133(1):57–62.
10. Dunphy JL, Taylor RG, Fuller PJ. Tissue distribution of rat glucagon receptor and GLP-1 receptor gene expression. **Mol Cell Endocrinol.** 1998 Jun 25;141(1–2):179–86.
11. Mayo KE, Miller LJ, Bataille D, Dalle S, Göke B, Thorens B, et al. International Union of Pharmacology. XXXV. The Glucagon Receptor Family. **Pharmacol Rev.** 2003 Mar 1;55(1):167–94.
12. Donnelly D. The structure and function of the glucagon-like peptide-1 receptor and its ligands. **Br J Pharmacol.** 2012 May;166(1):27–41.
13. Al-Sabah S. Molecular Pharmacology of the Incretin Receptors. **Med Princ Pract.** 2016;25(1):15–21.
14. Eng J, Kleinman WA, Singh L, Singh G, Raufman JP. Isolation and characterization of exendin-4, an exendin-3 analogue, from *Heloderma suspectum* venom. Further

evidence for an exendin receptor on dispersed acini from guinea pig pancreas. **J Biol Chem.** 1992 Apr 15;267(11):7402–5.

15. Göke R, Fehmann HC, Linn T, Schmidt H, Krause M, Eng J, et al. Exendin-4 is a high potency agonist and truncated exendin-(9-39)-amide an antagonist at the glucagon-like peptide 1-(7-36)-amide receptor of insulin-secreting beta-cells. **J Biol Chem.** 1993 Sep 15;268(26):19650–5.

16. Fletcher MM, Halls ML, Christopoulos A, Sexton PM, Wootten D. The complexity of signalling mediated by the glucagon-like peptide-1 receptor. **Biochem Soc Trans.** 2016 Apr 15;44(2):582–8.

17. MacDonald PE, El-Kholy W, Riedel MJ, Salapatek AMF, Light PE, Wheeler MB. The multiple actions of GLP-1 on the process of glucose-stimulated insulin secretion. **Diabetes.** 2002 Dec;51 Suppl 3:S434–42.

18. Light PE, Manning Fox JE, Riedel MJ, Wheeler MB. Glucagon-Like Peptide-1 Inhibits Pancreatic ATP-Sensitive Potassium Channels via a Protein Kinase A- and ADP-Dependent Mechanism. **Mol Endocrinol.** 2002 Sep;16(9):2135–44.

19. Dzhura I, Chepurny OG, Leech CA, Roe MW, Dzhura E, Xu X, et al. Phospholipase C- ϵ links Epac2 activation to the potentiation of glucose-stimulated insulin secretion from mouse islets of Langerhans. **Islets.** 3(3):121–8.

20. Drucker DJ, Philippe J, Mojsov S, Chick WL, Habener JF. Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1987 May;84(10):3434–8.

21. Fehmann HC, Habener JF. Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-I(7-37) stimulation of proinsulin gene expression and proinsulin biosynthesis in insulinoma beta TC-1 cells. **Endocrinology.** 1992 Jan;130(1):159–66.

22. Komatsu R, Matsuyama T, Namba M, Watanabe N, Itoh H, Kono N, et al. Glucagonostatic and insulinotropic action of glucagonlike peptide I-(7-36)-amide. **Diabetes.** 1989 Jul;38(7):902–5.

23. D'Alessio DA, Fujimoto WY, Ensink JW. Effects of glucagonlike peptide I-(7-36) on release of insulin, glucagon, and somatostatin by rat pancreatic islet cell monolayer cultures. **Diabetes.** 1989 Dec;38(12):1534–8.

24. Samols E, Bonner-Weir S, Weir GC. 2 Intra-islet insulin—glucagon—somatostatin relationships. **Clin Endocrinol Metab.** 1986 Feb 1;15(1):33–58.

25. Nauck MA, Niedereichholz U, Ettler R, Holst JJ, Orskov C, Ritzel R, et al. Glucagon-like peptide 1 inhibition of gastric emptying outweighs its insulinotropic effects in healthy humans. **Am J Physiol.** 1997 Nov;273(5 Pt 1):E981–8.

26. Holz IV GG, Kiihtreiber WM, Habener JF. Pancreatic beta-cells are rendered glucose-competent by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1(7-37). **Nature.** 1993

Jan 28;361(6410):362–5.

27. Li Y, Hansotia T, Yusta B, Ris F, Halban PA, Drucker DJ. Glucagon-like Peptide-1 Receptor Signaling Modulates β Cell Apoptosis. **J Biol Chem.** 2003 Jan 3;278(1):471–8.
28. Stoffers DA, Kieffer TJ, Hussain MA, Drucker DJ, Bonner-Weir S, Habener JF, et al. Insulinotropic glucagon-like peptide 1 agonists stimulate expression of homeodomain protein IDX-1 and increase islet size in mouse pancreas. **Diabetes.** 2000 May;49(5):741–8.
29. Rolin B, Larsen MO, Gotfredsen CF, Deacon CF, Carr RD, Wilken M, et al. The long-acting GLP-1 derivative NN2211 ameliorates glycemia and increases β -cell mass in diabetic mice. **Am J Physiol Metab.** 2002 Oct;283(4):E745–52.
30. D'Alessio DA, Vogel R, Prigeon R, Laschansky E, Koerker D, Eng J, et al. Elimination of the action of glucagon-like peptide 1 causes an impairment of glucose tolerance after nutrient ingestion by healthy baboons. **J Clin Invest.** 1996 Jan 1;97(1):133–8.
31. Kolligs F, Fehmann HC, Göke R, Göke B. Reduction of the incretin effect in rats by the glucagon-like peptide 1 receptor antagonist exendin (9-39) amide. **Diabetes.** 1995 Jan;44(1):16–9.
32. Edwards CM, Todd JF, Mahmoudi M, Wang Z, Wang RM, Ghatei MA, et al. Glucagon-like peptide 1 has a physiological role in the control of postprandial glucose in humans: studies with the antagonist exendin 9-39. **Diabetes.** 1999 Jan;48(1):86–93.
33. Nauck M, Stöckmann F, Ebert R, Creutzfeldt W. Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. **Diabetologia.** 1986 Jan;29(1):46–52.
34. Mentlein R, Gallwitz B, Schmidt WE. Dipeptidyl-peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1(7-36)amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum. **Eur J Biochem.** 1993 Jun 15;214(3):829–35.
35. Deacon CF, Johnsen AH, Holst JJ. Degradation of glucagon-like peptide-1 by human plasma in vitro yields an N-terminally truncated peptide that is a major endogenous metabolite in vivo. **J Clin Endocrinol Metab.** 1995 Mar;80(3):952–7.
36. Nauck MA, Vilsboll T, Gallwitz B, Garber A, Madsbad S. Incretin-Based Therapies: Viewpoints on the way to consensus. **Diabetes Care.** 2009 Nov 1;32(2):S223–31.
37. Godinho R, Mega C, Teixeira-de-Lemos E, Carvalho E, Teixeira F, Fernandes R, et al. The Place of Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitors in Type 2 Diabetes Therapeutics: A “Me Too” or “the Special One” Antidiabetic Class? **J Diabetes Res.** 2015;2015:1–28.
38. Dhillon S. Sitagliptin: A review of its use in the management of the type 2 diabetes mellitus. **Drugs.** 2010 Mar;70(4):489–512.

39. Scott LJ. Alogliptin: A Review of its Use in the Management of Type 2 Diabetes Mellitus. **Drugs**. 2010 Oct;70(15):2051–72.
40. Scott LJ. Linagliptin: In Type 2 Diabetes Mellitus. **Drugs**. 2011 Mar;71(5):611–24.
41. He Y-L. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Vildagliptin. **Clin Pharmacokinet**. 2012 Mar;51(3):147–62.
42. Yang LPH. Saxagliptin: A Review of its Use as Combination Therapy in the Management of Type 2 Diabetes Mellitus in the EU. **Drugs**. 2012 Jan;72(2):229–48.
43. Pi-Sunyer X, Astrup A, Fujioka K, Greenway F, Halpern A, Krempf M, et al. A Randomized, Controlled Trial of 3.0 mg of Liraglutide in Weight Management. **N Engl J Med**. 2015 Jul 2;373(1):11–22.
44. Christou GA, Katsiki N, Kiortsis DN. The Current Role of Liraglutide in the Pharmacotherapy of Obesity. **Curr Vasc Pharmacol**. 2016;14(2):201–7.
45. Fineman MS, Mace KF, Diamant M, Darsow T, Cirincione BB, Booker Porter TK, et al. Clinical relevance of anti-exenatide antibodies: safety, efficacy and cross-reactivity with long-term treatment. **Diabetes, Obes Metab**. 2012 Jun;14(6):546–54.
46. RUSSELLJONES D. Molecular, pharmacological and clinical aspects of liraglutide, a once-daily human GLP-1 analogue. **Mol Cell Endocrinol**. 2009 Jan 15;297(1–2):137–40.
47. Rosenstock J, Raccach D, Korányi L, Maffei L, Boka G, Miossec P, et al. Efficacy and safety of lixisenatide once daily versus exenatide twice daily in type 2 diabetes inadequately controlled on metformin: a 24-week, randomized, open-label, active-controlled study (GetGoal-X). **Diabetes Care**. 2013 Oct;36(10):2945–51.
48. Trujillo JM, Nuffer W. Albiglutide: a new GLP-1 receptor agonist for the treatment of type 2 diabetes. **Ann Pharmacother**. 2014 Nov 18;48(11):1494–501.
49. Rosenstock J, Reusch J, Bush M, Yang F, Stewart M, Albiglutide Study Group. Potential of Albiglutide, a Long-Acting GLP-1 Receptor Agonist, in Type 2 Diabetes: A randomized controlled trial exploring weekly, biweekly, and monthly dosing. **Diabetes Care**. 2009 Oct 1;32(10):1880–6.
50. Kuritzky L, Umpierrez G, Ekoé JM, Mancillas-Adame L, Landó LF. Safety and Efficacy of Dulaglutide, a Once Weekly GLP-1 Receptor Agonist, for the Management of Type 2 Diabetes. **Postgrad Med**. 2014 Oct 13;126(6):60–71.
51. Ussher JR, Baggio LL, Campbell JE, Mulvihill EE, Kim M, Kabir MG, et al. Inactivation of the cardiomyocyte glucagon-like peptide-1 receptor (GLP-1R) unmasks cardiomyocyte-independent GLP-1R-mediated cardioprotection. **Mol Metab**. 2014 Aug;3(5):507–17.
52. Woerle H-J, Albrecht M, Linke R, Zschau S, Neumann C, Nicolaus M, et al.

Importance of changes in gastric emptying for postprandial plasma glucose fluxes in healthy humans. **Am J Physiol Metab.** 2008 Jan;294(1):E103–9.

53. Nauck MA, Heimesaat MM, Behle K, Holst JJ, Nauck MS, Ritzel R, et al. Effects of Glucagon-Like Peptide 1 on Counterregulatory Hormone Responses, Cognitive Functions, and Insulin Secretion during Hyperinsulinemic, Stepped Hypoglycemic Clamp Experiments in Healthy Volunteers. **J Clin Endocrinol Metab.** 2002 Mar;87(3):1239–46.

54. Göke R, Larsen PJ, Mikkelsen JD, Sheikh SP. Distribution of GLP-1 binding sites in the rat brain: evidence that exendin-4 is a ligand of brain GLP-1 binding sites. **Eur J Neurosci.** 1995 Nov 1;7(11):2294–300.

55. Flint A, Raben A, Astrup A, Holst JJ. Glucagon-like peptide 1 promotes satiety and suppresses energy intake in humans. **J Clin Invest.** 1998 Feb 1;101(3):515–20.

56. Meier JJ, Gallwitz B, Schmidt WE, Nauck MA. Glucagon-like peptide 1 as a regulator of food intake and body weight: therapeutic perspectives. **Eur J Pharmacol.** 2002 Apr 12;440(2–3):269–79.

57. Ban K, Noyan-Ashraf MH, Hoefer J, Bolz S-S, Drucker DJ, Husain M. Cardioprotective and Vasodilatory Actions of Glucagon-Like Peptide 1 Receptor Are Mediated Through Both Glucagon-Like Peptide 1 Receptor-Dependent and –Independent Pathways. **Circulation.** 2008 May 6;117(18):2340–50.

58. Ravassa S, Zudaire A, Carr RD, Díez J. Antiapoptotic effects of GLP-1 in murine HL-1 cardiomyocytes. **Am J Physiol Circ Physiol.** 2011 Apr;300(4):H1361–72.

59. Timmers L, Henriques JPS, de Kleijn DPV, DeVries JH, Kemperman H, Steendijk P, et al. Exenatide Reduces Infarct Size and Improves Cardiac Function in a Porcine Model of Ischemia and Reperfusion Injury. **J Am Coll Cardiol.** 2009 Feb 10;53(6):501–10.

60. Ponzani P. Long-term effectiveness and safety of liraglutide in clinical practice - Minerva Endocrinologica 2013 March;38(1):103-12 - Minerva Medica - Journals. **Minerva Endocrinol.** 2013;38(1):103–12.

61. Ding L, Zhang J. Glucagon-like peptide-1 activates endothelial nitric oxide synthase in human umbilical vein endothelial cells. **Acta Pharmacol Sin.** 2012 Jan 28;33(1):75–81.

62. Erdogdu Ö, Eriksson L, Xu H, Sjöholm Å, Zhang Q, Nyström T. Exendin-4 protects endothelial cells from lipoapoptosis by PKA, PI3K, eNOS, p38 MAPK, and JNK pathways. **J Mol Endocrinol.** 2013 Apr;50(2):229–41.

63. Kodera R, Shikata K, Kataoka HU, Takatsuka T, Miyamoto S, Sasaki M, et al. Glucagon-like peptide-1 receptor agonist ameliorates renal injury through its anti-inflammatory action without lowering blood glucose level in a rat model of type 1 diabetes. **Diabetologia.** 2011 Apr 21;54(4):965–78.

64. Park CW, Kim HW, Ko SH, Lim JH, Ryu GR, Chung HW, et al. Long-Term Treatment of Glucagon-Like Peptide-1 Analog Exendin-4 Ameliorates Diabetic Nephropathy through Improving Metabolic Anomalies in db/db Mice. **J Am Soc Nephrol.** 2007 Apr;18(4):1227–38.
65. Gutzwiller JP, Tschopp S, Bock A, Zehnder CE, Huber AR, Kreyenbuehl M, et al. Glucagon-like peptide 1 induces natriuresis in healthy subjects and in insulin-resistant obese men. **J Clin Endocrinol Metab.** 2004;89(6):3055–61.
66. Gutzwiller JP, Hruz P, Huber AR, Hamel C, Zehnder C, Drewe J, et al. Glucagon-like peptide-1 is involved in sodium and water homeostasis in humans. **Digestion.** 2006;73(2–3):142–50.
67. Moreno C, Mistry M, Roman RJ. Renal effects of glucagon-like peptide in rats. **Eur J Pharmacol.** 2002;434(3):163–7.
68. Crajoinas RO, Oricchio FT, Pessoa TD, Pacheco BPM, Lessa LMA, Malnic G, et al. Mechanisms mediating the diuretic and natriuretic actions of the incretin hormone glucagon-like peptide-1. **AJP Ren Physiol.** 2011;301(2):F355–63.
69. Tang-Christensen M, Larsen PJ, Goke R, Fink-Jensen A, Jessop DS, Moller M, et al. Central administration of GLP-1-(7-36) amide inhibits food and water intake in rats. **Am J Physiol Integr Comp Physiol.** 1996 Oct;271(4):R848–56.
70. Von Websky K, Reichetzeder C, Hoher B. Physiology and pathophysiology of incretins in the kidney. **Curr Opin Nephrol Hypertens.** 2014;23(1):54–60.
71. Girardi ACC, Degray BC, Nagy T, Biemesderfer D, Aronson PS. Association of Na⁺-H⁺ Exchanger Isoform NHE3 and Dipeptidyl Peptidase IV in the Renal Proximal Tubule. **J Biol Chem.** 2001 Dec 7;276(49):46671–7.
72. Girardi ACC, Fukuda LE, Rossoni LV, Malnic G, Rebouças NA. Dipeptidyl peptidase IV inhibition downregulates Na⁺-H⁺ exchanger NHE3 in rat renal proximal tubule. **Am J Physiol Physiol.** 2008 Feb;294(2):F414–22.
73. Savignano FA, Crajoinas RO, Pacheco BPM, Campos LCG, Shimizu MHM, Seguro AC, et al. Attenuated diuresis and natriuresis in response to glucagon-like peptide-1 in hypertensive rats are associated with lower expression of the glucagon-like peptide-1 receptor in the renal vasculature. **Eur J Pharmacol.** 2017 Sep 15;811:38–47.
74. Jensen EP, Poulsen SS, Kissow H, Holstein-Rathlou N-H, Deacon CF, Jensen BL, et al. Activation of GLP-1 receptors on vascular smooth muscle cells reduces the autoregulatory response in afferent arterioles and increases renal blood flow. **Am J Physiol Physiol.** 2015 Apr 15;308(8):F867–77.
75. Farah LXS, Valentini V, Pessoa TD, Malnic G, McDonough AA, Girardi ACC. The physiological role of glucagon-like peptide-1 in the regulation of renal function. **Am J Physiol Physiol.** 2016;310(2):F123–7.

76. Yu M, Moreno C, Hoagland KM, Dahly A, Ditter K, Mistry M, et al. Antihypertensive effect of glucagon-like peptide 1 in Dahl salt-sensitive rats. **J Hypertens.** 2003;21(6):1125–35.
77. Hirata K, Kume S, Araki S, Sakaguchi M, Chin-Kanasaki M, Isshiki K, et al. Exendin-4 has an anti-hypertensive effect in salt-sensitive mice model. **Biochem Biophys Res Commun.** 2009 Feb 27;380(1):44–9.
78. Wang B, Zhong J, Lin H, Zhao Z, Yan Z, He H, et al. Blood pressure-lowering effects of GLP-1 receptor agonists exenatide and liraglutide: a meta-analysis of clinical trials. **Diabetes, Obes Metab.** 2013 Aug;15(8):737–49.
79. Okerson T, Yan P, Stonehouse A, Brodows R. Effects of exenatide on systolic blood pressure in subjects with type 2 diabetes. **Am J Hypertens.** 2010;23(3):334–9.
80. Yoshihara M, Akasaka H, Ohnishi H, Miki T, Furukawa T, Yuda S, et al. Glucagon-like peptide-1 secretory function as an independent determinant of blood pressure: analysis in the Tanno-Sobetsu study. **PLoS One.** 2013;8(7):e67578.
81. Wadei HM, Textor SC. The role of the kidney in regulating arterial blood pressure. **Nat Rev Nephrol.** 2012 Oct 28;8(10):602–9.
82. Schroeder HA. Pathogenesis of hypertension. **Am J Med.** 1951;10(2):189–209.
83. Whelton PK, Carey RM, Aronow WS, Casey DE, Collins KJ, Dennison Himmelfarb C, et al. Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults. **J Am Coll Cardiol.** 2018 May 15;71(19):e127–248.
84. Heimann J, JE K, Zatz R. Fisiopatologia da hipertensão arterial. In: **Fisiopatologia renal.** São Paulo: Atheneu; 2002.
85. Guyton AC. Arterial Pressure and Hypertension. 3rd ed. **Circulatory Physiology.** Philadelphia: Saunders; 1980. 564 p.
86. Cowley AW, Liard JF, Guyton AC. Role of baroreceptor reflex in daily control of arterial blood pressure and other variables in dogs. **Circ Res.** 1973 May;32(5):564–76.
87. Guyton A, Hall J. **Tratado de Fisiologia Médica.** 11^a. Saunders; 2006. 1067 p.
88. Vallon V, Schwark J-R, Richter K, Hropot M. Role of Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 in nephron function: micropuncture studies with S3226, an inhibitor of NHE3. **Am J Physiol Physiol.** 2000 Mar;278(3):F375–9.
89. Cano A. Characterization of the rat NHE3 promoter. **Am J Physiol Physiol.** 1996 Sep;271(3):F629–36.
90. He P, Yun CC. Mechanisms of the regulation of the intestinal Na⁺/H⁺ exchanger NHE3. **J Biomed Biotechnol.** 2010;2010:238080.
91. Biemesderfer D, Pizzonia J, Abu-Alfa A, Exner M, Reilly R, Igarashi P, et al. NHE3:

- a Na⁺/H⁺ exchanger isoform of renal brush border. **Am J Physiol Physiol.** 1993 Nov;265(5):F736–42.
92. Boron W, Boulpaep E. **Medical Physiology.** 2nd ed. Philadelphia: Saunders; 2012. 1293 p.
93. Schultheis PJ, Clarke LL, Meneton P, Miller ML, Soleimani M, Gawenis LR, et al. Renal and intestinal absorptive defects in mice lacking the NHE3 Na⁺/H⁺ exchanger. **Nat Genet.** 1998 Jul;19(3):282–5.
94. Ledoussal C, Lorenz JN, Nieman ML, Soleimani M, Schultheis PJ, Shull GE. Renal salt wasting in mice lacking NHE3 Na⁺/H⁺ exchanger but not in mice lacking NHE2. **Am J Physiol Physiol.** 2001 Oct;281(4):F718–27.
95. Wang T, Yang C-L, Abbiati T, Schultheis PJ, Shull GE, Giebisch G, et al. Mechanism of proximal tubule bicarbonate absorption in NHE3 null mice. **Am J Physiol Physiol.** 1999 Aug;277(2):F298–302.
96. Pouyssegur J. Molecular biology and hormonal regulation of vertebrate Na⁺/H⁺ exchanger isoforms. **Ren Physiol Biochem.** 17(3–4):190–3.
97. Donowitz M, Li X. Regulatory Binding Partners and Complexes of NHE3. **Physiol Rev.** 2007 Jul;87(3):825–72.
98. Carraro-Lacroix LR, Malnic G, Girardi ACC. Regulation of Na/H exchanger NHE3 by glucagon-like peptide 1 receptor agonist exendin-4 in renal proximal tubule cells. **Am J Physiol Physiol.** 2009 Dec;297(6):F1647–55.
99. Girardi ACC, Knauf F, Demuth H-U, Aronson PS. Role of dipeptidyl peptidase IV in regulating activity of Na⁺/H⁺ exchanger isoform NHE3 in proximal tubule cells. **Am J Physiol Physiol.** 2004 Nov;287(5):C1238–45.
100. Rieg T, Gerasimova M, Murray F, Masuda T, Tang T, Rose M, et al. Natriuretic effect by exendin-4, but not the DPP-4 inhibitor alogliptin, is mediated via the GLP-1 receptor and preserved in obese type 2 diabetic mice. **AJP Ren Physiol.** 2012;303(7):F963–71.
101. Chen J, Wang D, Wang F, Shi S, Chen Y, Yang B, et al. Exendin-4 inhibits structural remodeling and improves Ca²⁺ homeostasis in rats with heart failure via the GLP-1 receptor through the eNOS/cGMP/PKG pathway. **Peptides.** 2017 Apr;90:69–77.
102. Comissão de ética no Uso de Animais - CEUA. **Guia anestesia e analgesia em animais de laboratório.** São Paulo; 2017.
103. LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem.** 1951 Nov;193(1):265–75.
104. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.** 1970 Aug 15;227(5259):680–5.

105. Kobori H, Harrison-Bernard LM, Navar LG. Urinary excretion of angiotensinogen reflects intrarenal angiotensinogen production. **Kidney Int.** 2002 Feb;61(2):579–85.
106. Kobori H, Nishiyama A, Harrison-Bernard LM, Navar LG. Urinary angiotensinogen as an indicator of intrarenal Angiotensin status in hypertension. **Hypertens (Dallas, Tex 1979).** 2003 Jan;41(1):42–9.
107. Crajoinas RO, Pessoa TD, Rodrigues M V., Malnic G, Girardi ACC. Changes in the activity and expression of protein phosphatase-1 accompany the differential regulation of NHE3 before and after the onset of hypertension in spontaneously hypertensive rats. **Acta Physiol.** 2014;211(2):395–408.
108. Pacheco BP, Crajoinas RO, Couto GK, Davel APC, Lessa LM, Rossoni L V., et al. Dipeptidyl peptidase IV inhibition attenuates blood pressure rising in young spontaneously hypertensive rats. **J Hypertens.** 2011;29(3):520–8.
109. Crajoinas RO, Polidoro JZ, Carneiro de Moraes CPA, Castelo-Branco RC, Girardi ACC. Angiotensin II counteracts the effects of cAMP/PKA on NHE3 activity and phosphorylation in proximal tubule cells. **Am J Physiol Physiol.** 2016 Nov 1;311(5):C768–76.
110. Gros R, You X, Baggio LL, Kabir MG, Sadi AM, Mungrue IN, et al. Cardiac Function in Mice Lacking the Glucagon-Like Peptide-1 Receptor. **Endocrinology.** 2003 Jun 1;144(6):2242–52.
111. Noonan WT, Woo AL, Nieman ML, Prasad V, Schultheis PJ, Shull GE, et al. Blood pressure maintenance in NHE3-deficient mice with transgenic expression of NHE3 in small intestine. **Am J Physiol Integr Comp Physiol.** 2005 Mar;288(3):R685–91.
112. McDonough AA. Mechanisms of proximal tubule sodium transport regulation that link extracellular fluid volume and blood pressure. **Am J Physiol Integr Comp Physiol.** 2010 Apr;298(4):R851–61.
113. Girardi ACC, Di Sole F. Deciphering the mechanisms of the Na⁺/H⁺ exchanger-3 regulation in organ dysfunction. **Am J Physiol Physiol.** 2012 Jun 1;302(11):C1569–87.
114. Schlatter P, Beglinger C, Drewe J, Gutmann H. Glucagon-like peptide 1 receptor expression in primary porcine proximal tubular cells. **Regul Pept.** 2007 Jun 7;141(1–3):120–8.
115. Thomson SC, Kashkouli A, Singh P. Glucagon-like peptide-1 receptor stimulation increases GFR and suppresses proximal reabsorption in the rat. **Am J Physiol Physiol.** 2013;304(2):F137–44.
116. Ishibashi Y, Matsui T, Ojima A, Nishino Y, Nakashima S, Maeda S, et al. Glucagon-like peptide-1 inhibits angiotensin II-induced mesangial cell damage via protein kinase A. **Microvasc Res.** 2012;84(3):395–8.
117. Skov J, Persson F, Frøkiær J, Christiansen JS. Tissue renin-angiotensin systems: A

unifying hypothesis of metabolic disease. **Front Endocrinol (Lausanne)**. 2014;5(FEB):1–7.

118. Asmar A, Simonsen L, Asmar M, Madsbad S, Holst JJ, Frandsen E, et al. Renal extraction and acute effects of glucagon-like peptide-1 on central and renal hemodynamics in healthy men. **Am J Physiol Metab**. 2015 Apr 15;308(8):E641–9.

119. Skov J, Dejgaard A, Frøkiær J, Holst JJ, Jonassen T, Rittig S, et al. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1): Effect on kidney hemodynamics and renin-angiotensin-aldosterone system in healthy men. **J Clin Endocrinol Metab**. 2013;98(4):664–71.

120. Skov J, Pedersen M, Holst JJ, Madsen B, Goetze JP, Rittig S, et al. Short-term effects of liraglutide on kidney function and vasoactive hormones in type 2 diabetes: a randomized clinical trial. **Diabetes, Obes Metab**. 2016 Jun;18(6):581–9.

121. Tonneijck L, Muskiet MHA, Smits MM, van Raalte DH, Diamant M. Combining incretin-based drugs and RAAS inhibitors: more cons than pros? **Lancet Diabetes Endocrinol**. 2014 Sep;2(9):684–5.

122. Muskiet MHA, Smits MM, Morsink LM, Diamant M. The gut–renal axis: do incretin-based agents confer renoprotection in diabetes? **Nat Rev Nephrol**. 2014 Feb 24;10(2):88–103.

123. Fuster DG, Bobulescu IA, Zhang J, Wade J, Moe OW. Characterization of the regulation of renal Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 by insulin. **Am J Physiol Physiol**. 2007 Feb;292(2):F577–85.

124. Turner JR, Black ED. NHE3-dependent cytoplasmic alkalinization is triggered by Na⁺-glucose cotransport in intestinal epithelia. **Am J Physiol Physiol**. 2001 Nov;281(5):C1533–41.

125. Packer M. Role of the sodium-hydrogen exchanger in mediating the renal effects of drugs commonly used in the treatment of type 2 diabetes. **Diabetes, Obes Metab**. 2018 Apr 1;20(4):800–11.

126. Kobayashi S, Maesato K, Moriya H, Ohtake T, Ikeda T. Insulin resistance in patients with chronic kidney disease. **Am J Kidney Dis**. 2005 Feb;45(2):275–80.

127. Emoto M, Nishizawa Y, Maekawa K, Kawagishi T, Kogawa K, Hiura Y, et al. Insulin resistance in non-obese, non-insulin-dependent diabetic patients with diabetic nephropathy. **Metabolism**. 1997 Sep;46(9):1013–8.

128. Welsh GI, Hale LJ, Eremina V, Jeansson M, Maezawa Y, Lennon R, et al. Insulin Signaling to the Glomerular Podocyte Is Critical for Normal Kidney Function. **Cell Metab**. 2010 Oct 6;12(4):329–40.

129. Horita S, Seki G, Yamada H, Suzuki M, Koike K, Fujita T. Roles of renal proximal tubule transport in the pathogenesis of hypertension. **Curr Hypertens Rev**. 2013 May;9(2):148–55.

130. Baum M. Insulin stimulates volume absorption in the rabbit proximal convoluted tubule. **J Clin Invest.** 1987 Apr 1;79(4):1104–9.
131. Zheng Y, Yamada H, Sakamoto K, Horita S, Kunimi M, Endo Y, et al. Roles of Insulin Receptor Substrates in Insulin-Induced Stimulation of Renal Proximal Bicarbonate Absorption. **J Am Soc Nephrol.** 2005 Aug;16(8):2288–95.
132. Seki G, Yamada H, Horita S, Suzuki M, Yamazaki O, Van Paesschen W, et al. Physiological and pathophysiological roles of the electrogenic Na⁺-HCO₃⁻ cotransporter NBCe1. **Open J Mol Integr Physiol.** 2011;1:9–16.
133. Nakamura M, Yamazaki O, Shirai A, Horita S, Satoh N, Suzuki M, et al. Preserved Na/HCO₃ cotransporter sensitivity to insulin may promote hypertension in metabolic syndrome. **Kidney Int.** 2015 Mar;87(3):535–42.
134. Stevens VA, Saad S, Poronnik P, Fenton-Lee CA, Polhill TS, Pollock CA. The role of SGK-1 in angiotensin II-mediated sodium reabsorption in human proximal tubular cells. **Nephrol Dial Transplant.** 2008 Mar 7;23(6):1834–43.
135. Saad S, Agapiou DJ, Chen X-M, Stevens V, Pollock CA. The role of Sgk-1 in the upregulation of transport proteins by PPAR-GAMMA agonists in human proximal tubule cells. **Nephrol Dial Transplant.** 2008 Dec 4;24(4):1130–41.
136. Geibel J, Giebisch G, Boron WF. Angiotensin II stimulates both Na⁽⁺⁾-H⁺ exchange and Na⁺/HCO₃⁻ cotransport in the rabbit proximal tubule. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1990 Oct;87(20):7917–20.